

THAÍS SAAD SCZEPANSKI

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA
ARIIDAE (TELEOSTEI, SILURIFORMES) PERTENCENTES AO
LITORAL PARANAENSE**

**CURITIBA - PR
2008**

THAÍS SAAD SCZEPANSKI

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA
ARIIDAE (TELEOSTEI, SILURIFORMES) PERTENCENTES AO
LITORAL PARANAENSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal do
Paraná (UFPR), como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Genética

Orientadora: Prof^a. Dra. Marta Margarete
Cestari

Co-Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira
Artoni

**CURITIBA - PR
2008**

À minha, santa e eterna, vó Ivone...

AGRADECIMENTOS

A Deus...

À minha família... especialmente meus 'ermãos' Felipe e Mayra

À minha orientadora, Margarete, por ter aceitado a orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada...

Rafa... Por TUDO!!!

Felipe... Fucão... Cabelo... Bradock... Pastel... Tigrão... Zé... Jean...

Wane... Taynah... Cris... Nédia... Lalá... Jana... Marcos...

Mário...

Bruna... Michele... Ana Flávia...

Rigoti... Delly... Patê... Bernardi... Márcia... Argentino... Sense... Dani... ClinClin...
Renata... Vítor... Ana Paula...

Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e do Departamento de Genética...

À secretária Lú...

Alberto Fenocchio...

Marcelo Vicari...

Roberto Artoni...

Alexandre Marцениuk...

... por aconselharem, motivarem, orientarem, cuidarem, ouvirem, protegerem e colaborarem ao longo desta fase da minha vida, tumultuada, marcante e cheia de incertezas. Para além das palavras escritas, espero encontrar melhor forma e melhor momento para retribuir tudo o que fizeram por mim ao longo destes dois anos.

Aos meus pais, José Humberto e Norma, o meu maior agradecimento, por terem sido o contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

À Capes pelo apoio financeiro.

“Avalia-se a inteligência de um indivíduo pela quantidade de incertezas que ele é capaz de suportar.”

Immanuel Kant

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELA.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 O AMBIENTE E A DIVERSIDADE DE PEIXES MARINHOS DA COSTA PARANAENSE.....	01
1.2 POSIÇÃO TAXONÔMICA NA CLASSIFICAÇÃO ICTIOLÓGICA e ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA ARIIDAE.....	03
1.3 ASPECTOS CARIOTÍPICOS E FILOGENÉTICOS	08
1.3.1 Aspectos Gerais.....	08
1.3.2 Técnicas Citogenéticas e Citomoleculares.....	09
1.3.3 Aspectos Sistemáticos e Filogenéticos em Siluriformes.....	12
1.3.3.1 Família Ariidae.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 MATERIAL	19
4.2 MÉTODOS.....	21
4.2.1 Das Coletas.....	21
4.2.2 Da Obtenção de metáfases mitóticas	21
4.2.3 Método da coloração convencional - Giemsa.....	22
4.2.4 Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C)	22
4.2.5 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).....	23
4.2.6 Dupla Coloração CMA ₃ /DAPI.....	23
4.2.7 Clivagem com Endonuclease de Restrição	23
4.2.8 Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sondas rDNA 18S e 5S.....	24
4.2.9 Fotomicrografia.....	26
4.2.10 Identificação dos cromossomos e montagem dos cariótipos.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 FÓRMULA CARIOTÍPICA.....	29

5.2 BANDAMENTO C.....	34
5.3 ENZIMA DE RESTRIÇÃO.....	35
5.4 FLUOROCROMOS BASE- ESPECÍFICOS.....	40
5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS RONS ATRAVÉS DA IMPREGNAÇÃO COM AgNO ₃ ..	48
5.6 HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i> COM SONDA rDNA 18S.....	50
5.7 HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE <i>in situ</i> COM SONDA rDNA 5S.....	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – MAPA DO LITORAL DO ESTADO DO PARANÁ.....	02
FIGURA 02 – RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS OSTARIOPHYSI MODIFICADO DE FINK e FINK (1981).....	13
FIGURA 03 – DISTRIBUIÇÃO DO 2n (a) e NF (b) ENTRE OS SILURIFORMES (RETIRADO DE OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000).....	15
FIGURA 04 – EXEMPLARES DAS ESPÉCIES <i>G. genidens</i> (a), <i>A. luniscutis</i> (b) e <i>G. barbatus</i> (c) COM 30 cm, 36,4 cm e 28 cm DE COMPRIMENTO TOTAL, RESPECTIVAMENTE. ...	19
FIGURA 05 - LOCAIS DE COLETA.....	20
FIGURA 06 - CARIÓTIPO EM GIEMSA DE <i>G. genidens</i> (a), <i>A. luniscutis</i> (b) e <i>G.</i> <i>barbatus</i> (c).....	32
FIGURA 07 – PADRÃO DE BANDAMENTO C ENCONTRADO PARA <i>Genidens</i> <i>genidens</i> (a), <i>Aspistor luniscutos</i> (b) e <i>Genidens barbatus</i> (c).....	36
FIGURA 08 - COLORAÇÃO SEQUENCIAL EM <i>Aspistor luniscutis</i> : BANDAMENTO C (a) E IMPREGNAÇÃO COM NITRATO DE PRATA (b).....	37
FIGURA 09 - CROMOSSOMOS METAFÁSICOS DE <i>G. genidens</i> (a), <i>G. barbatus</i> (b) e <i>A. luniscutis</i> (c), APÓS TRATAMENTO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO (<i>Alu</i> I).....	39
FIGURA 10 – METÁFASE DE <i>Genidens genidens</i> , APÓS: DUPLA COLORAÇÃO CMA ₃ /DAPI (a,b,c) E TRATAMENTO COM AgNO ₃ (d).....	42
FIGURA 11 – METÁFASE DE <i>Aspistor luniscutis</i> , APÓS: DUPLA COLORAÇÃO CMA ₃ /DAPI (a,b,c) E TRATAMENTO COM AgNO ₃ (d).....	43
FIGURA 12 – METÁFASE DE <i>Genidens barbatus</i> , APÓS: DUPLA COLORAÇÃO CMA ₃ /DAPI (a,b,c) E TRATAMENTO COM AgNO ₃ (d).....	44
FIGURA 13 – METÁFASES DE <i>G. genidens</i> APÓS TRATAMENTO COM AgNO ₃ .	46
FIGURA 14 – METÁFASES DE <i>A. luniscutis</i> APÓS TRATAMENTO COM AgNO ₃ .	47
FIGURA 15 – METÁFASES DE <i>G. barbatus</i> APÓS TRATAMENTO COM AgNO ₃	47
FIGURA 16 – HIBRIDAÇÃO <i>in situ</i> EM <i>G. genidens</i> COM SONDA rDNA 18S	48
FIGURA 17 – HIBRIDAÇÃO <i>in situ</i> EM <i>G. barbatus</i> COM SONDA rDNA 18S.....	48
FIGURA 18 – HIBRIDAÇÃO <i>in situ</i> EM <i>A. luniscutis</i> COM SONDA rDNA 18S.....	49

FIGURA 19 - ASSOCIAÇÕES ENTRE OS GENES rDNA OBSERVADAS EM <i>G. genidens</i> (a), <i>Aspistor luniscutis</i> (b) e <i>G. barbatus</i> (c).....	49
FIGURA 20 – CARIÓTIPO DE <i>G. genidens</i> (a), <i>Genidens barbatus</i> (b) e <i>Aspistor luniscutis</i> (c), DESTACANDO O PAR PORTADOR DA RON	50
FIGURA 21 – HIBRIDAÇÃO <i>in situ</i> EM <i>G. genidens</i> COM SONDA rDNA 5S.....	52

LISTA DE TABELA

TABELA 01 - DADOS CITOGENÉTICOS DE PEIXES PERTENCENTES À FAMÍLIA ARIIDAE.....	17
---	----

RESUMO

A ordem Siluriformes, de distribuição cosmopolita, compreende um grupo de peixes formado por 37 famílias, sendo que apenas duas, Ariidae e Plotosidae, se adaptaram à água salgada. A família Ariidae, com cerca de 120 espécies, apresenta vários problemas de ordem sistemática e taxonômica devido à sua ampla distribuição geográfica e à semelhança morfológica existente entre seus representantes. Com o intuito de contribuir nos registros citogenéticos e, conseqüentemente, no entendimento das relações evolutivas que permeiam a história desta família, o presente estudo caracterizou cromossomicamente: duas populações da espécie *Genidens genidens* pertencentes à Baía de Antonina e Pontal do Paraná; duas populações de *Aspistor luniscutis* provenientes da Ilha do Mel e Baía de Guaratuba e uma população de *Genidens barbatus* oriunda da Baía de Guaratuba, utilizando-se de técnicas convencionais de análise cromossômica, diferentes bandamentos e hibridação fluorescente *in situ* com sondas rDNA 18S e 5S. As três espécies apresentaram o mesmo número diplóide ($2n=56$), um alto valor de número fundamental (NF) e padrões de bandamentos similares, reforçando a homogeneidade cariotípica proposta para o grupo. Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) simples puderam ser observadas no gênero *Genidens* e RONs múltiplas em *Aspistor* sendo este caráter, um importante marcador citotaxonômico para tais gêneros. Não foi encontrado heteromorfismo cromossômico sexual em *A. luniscutis* e em *G. genidens*. No entanto, para *G. barbatus*, podemos supor a existência de um sistema sexual do tipo XX/XY, apesar de terem sido capturados apenas exemplares machos desta espécie. Tendências de evolução cromossômica puderam ser aqui hipotetizadas, permitindo uma maior compreensão dos processos de diferenciação e evolução cariotípica, sendo úteis também na elaboração de hipóteses biogeográficas e filogenéticas que envolvem os representantes desta ordem. Os resultados aqui obtidos são inéditos e representam a mais completa caracterização cromossômica tanto para as espécies aqui coletadas, quanto para a família Ariidae como um todo, ressaltando a necessidade da ampliação deste tipo de estudo dentro do grupo.

Palavras-chave: Citogenética de Peixes, FISH, Bagre Marinho, Siluriformes

ABSTRACT

The order Siluriformes includes 37 recognized families of catfishes widely distributed and diverse in freshwaters. Only two families, Ariidae and Plotosidae, adapted to the salted water. The family Ariidae comprises about 120 catfish species presents several problems of systematic and taxonomic order, due your wide geographical distribution and existent morphologic likeness among their representatives. In order of contributing in the cytogenetic registrations and, consequently, in the understanding of the evolutionary relationships in the family, this study characterized cytogenetically: two populations of *Genidens genidens* species belonging to the Antonina Bay and Pontal do Paraná; two populations of *Aspitor luniscutis* coming of the Ilha do Mel and Gauratuba Bay and one population of *Genidens barbatus* originating from of the Guaratuba Bay using conventional techniques, different chromosomic banding and fluorescent hybridization *in situ* with 18S and 5S rDNA probes. The three species showed the diploid same number ($2n=56$), high value of fundamental number (FN) and patterns of banding similar, reinforcing the karyotypic homogeneity proposal for the group. Single nucleolar organizer regions (NORs) could be observed in the genus *Genidens* and multiple NORs in *Aspistor*, being this character an important cytotaxonomic marker for such genus. Sex-related chromosome differences were not detected in the *A. luniscutis* and *G. genidens* species. However for *G. barbatus*, we can suppose the existence of a sexual system of type XX/XY, in spite of they have just been captured exemplary males of this species. Tendencies of chromosomic evolution could be here hypothesized, provide a better understanding of the karyotypic diversity and chromosome evolution processes, being also useful in the elaboration of biographic and filogenetic hypothesis that involve the representatives of this order. The results here obtained are unpublished and they represent the more it completes characterization so much chromosomal here for the species collected, as for the family Ariidae as a whole, standing out the necessity of the amplification of this study type inside of the group.

Key words: Fish Cytogenetics, FISH, Catfish, Siluriformes

1 INTRODUÇÃO

1.1 O AMBIENTE E A DIVERSIDADE DE PEIXES MARINHOS DA COSTA PARANAENSE

Em rochas datadas do final do Cambriano (cerca de 450 milhões de anos atrás) foi possível evidenciar restos de organismos que, ao longo da história geológica da Terra, viriam a se tornar o grupo mais numeroso e diversificado entre os vertebrados, os peixes (NELSON, 1994).

Estima-se que existam mais de 24.500 espécies de peixes, que correspondem a mais da metade das formas vivas de vertebrados. Habitam diversos ambientes, podendo ser encontrados em águas com salinidades variando de 0 a 100%, e temperaturas entre -2°C e 44°C (NELSON, *op. cit.*). Do total de espécies de peixes conhecidas, cerca de 60% vivem no ambiente marinho (BERRA, 1981 apud CIPRIANO, 2005). A maior parte das espécies marinhas habitam as zonas costeiras (NELSON, *op. cit.*), onde desempenham papel de inquestionável importância ecológica, bem como se fazem presentes na cultura e nos hábitos dos povos que vivem nestas áreas (BIZERRIL e COSTA, 2001).

A costa brasileira apresenta cerca de 8.000 km de extensão. Nela se insere o litoral paranaense que, embora conhecido como o segundo menor litoral dos estados brasileiros com comprimento em linha reta em torno de 100 km, apresenta extensos complexos estuarinos originando uma costa recortada com extensão de 1.483km (ÂNGULO e ARAÚJO, 1996).

MAACK (1981) descreve o litoral paranaense como uma estreita faixa montanhosa que afundou por falhamentos complexos originando duas baías: 1) a de Paranaguá com uma área de 601 km² comunicando-se com o oceano através de canais separados pela Ilha do Mel denominados de Sueste (ao norte) e Galheta (ao sul), apresentando três eixos principais: a) o eixo leste-oeste, Paranaguá propriamente dita e a baía de Antonina; b) eixo norte-sul, constituindo a baía de Guaraqueçaba e a baía das Laranjeiras e c) eixo sudeste-noroeste, Baía do Pinheiros (CORRÊA, 2001) e 2) a de Guaratuba com aproximadamente 45 km² comunicando-se com o Oceano Atlântico por uma abertura de aproximadamente 500m, prolongando-se para dentro do continente por cerca de 15 km (CHAVES e

CORRÊA, 1998) (FIGURA 01). As conformações destas duas baías mostram serem sistemas acoplados com enormes estuários predominando a ação das correntes de maré sobre o fluxo fluvial.

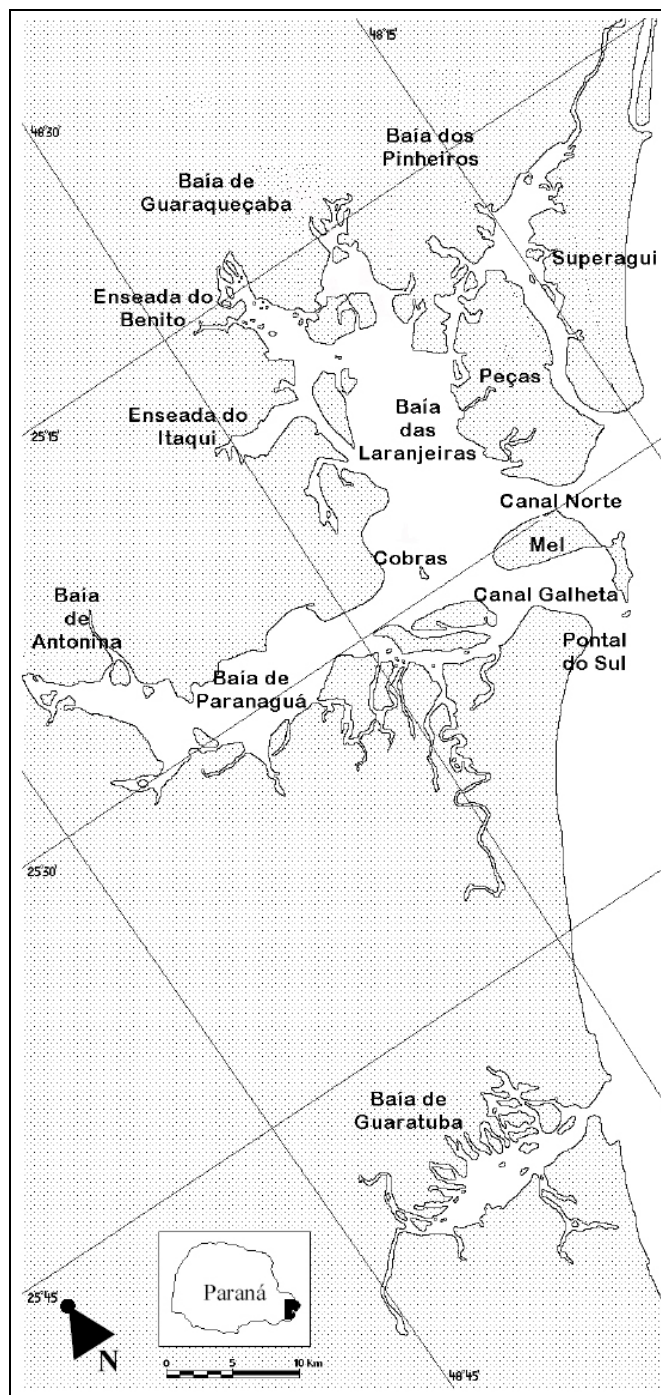


FIGURA 01 – MAPA DO LITORAL DO ESTADO DO PARANÁ
(RETIRADO DE CORRÊA, 2001 COM MODIFICAÇÕES)

Os estuários são formados devido à amplitude das marés e ao grande número de desembocaduras fluviais na região tropical. Consistem em ecossistemas de extrema importância, oferecendo recursos alimentares de grande diversidade e abundância, proteção contra predadores e outras condições ambientais que favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência de diversas espécies de peixes (PATERSON e WHITFIELD, 2000; CORRÊA, 2001). Muitas das etapas reprodutivas, incluindo dispersão de ovos e larvas, distribuição de juvenis e migrações, estão sincronizadas com o funcionamento dos ambientes estuarinos (BOCHLERT e MUNDY, 1988).

Quanto à ictiofauna, no litoral brasileiro existem pelo menos 1.297 espécies de peixes, sendo 1.155 de peixes ósseos (MENEZES *et al.*, 2003). Na costa paranaense são registradas 92 famílias, 191 gêneros e 313 espécies, das quais 289 são Actinopterygii (CHAVES e CORRÊA, 1998). A maior diversidade foi descrita para o sistema da Baía de Paranaguá com cerca de 201 espécies, sendo 28 cartilaginosos e 173 ósseos, estes pertencentes em sua grande maioria às famílias Scianidae, Carangidae, Ariidae, Gerreidae, Serranidae, Atherinidae, Mugilidae, Clupeidae e Tetraodontidae. Todas apresentam seu ciclo de vida, ou parte dele, essencialmente associado com as águas costeiras e estuarinas e nenhuma das espécies é considerada endêmica da região (CORRÊA, 2001). Para a Baía de Guaratuba foram descritas 61 espécies distribuídas em 28 famílias, melhor representadas por: Scianidae, Gerreidae, Carangidae, Ariidae, Haemulidae, Serranidae, e Bothidae (CHAVES e BOUCHEREAU, 1998).

1.2 POSIÇÃO TAXONÔMICA NA CLASSIFICAÇÃO ICTIOLÓGICA E ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA ARIIDAE

Os mais antigos peixes conhecidos, os Agnathas, surgiram no Ordoviciano, há 450 milhões de anos, sendo suas primeiras formas marinhas. Evoluindo divergentemente, os Gnatostomados, assim denominados pela presença de mandíbulas, tiveram seus primeiros exemplares surgidos no Siluriano Superior, tornando-se um grupo moderadamente grande e diversificado, extinguindo-se no Permiano (MOY-THOMAS e MILES, 1971).

Os peixes ósseos verdadeiros, os Osteichthyes, surgiram no Siluriano Superior (430 milhões de anos) (MOY-THOMAS e MILES, *op.cit.*). Contêm a maioria

dos peixes atuais, estando dividido em quatro classes: Dipnoi (peixes pulmonados), Crossopterygii (celacanto), Brachyopterygii (“bichirs”) e Actinopterygii (peixes cujas nadadeiras apresentam raios de sustentação) (BRUM, 1995). A classe Actinopterygii é composta pelas subclasses Chondrostei e Neopterygii. Esta última está dividida nas infraclasses Halecostomi e Gynghlimodi (NELSON, 1994).

A infraclasse Halecostomi está dividida em Halecomorpha e Teleostei (NELSON, 1994), esta sendo considerada a mais derivada constituinte da Classe Actinopterygii (BRUM e GALETTI Jr., 1997) representando o mais numeroso e bem sucedido grupo de peixes, devido à abundância, diversidade e capacidade de se adaptar aos diferentes tipos de habitats (ARRATIA, 2000). Corresponde aproximadamente a 96% de todos os peixes existentes perfazendo 23.637 espécies distribuídas em 38 ordens e 426 famílias (NELSON, *op. cit.*).

Os teleósteos atuais podem ser divididos em quatro subdivisões: Osteoglossomorpha, Elopomorpha, Clupeomorpha e Euteleostei, formando um grupo natural e monofilético (NELSON, 1994). Todos os peixes incluídos nestas quatro subdivisões possuem esqueleto caudal e modificações na musculatura da mandíbula, que os distinguem dos outros actinopterígeos.

Os Euteleósteos destacam-se entre os grupos da divisão Teleostei, possuindo cerca de 17.000 espécies em 25 ordens e 375 famílias (NELSON, 1994). Compreendem os Protacanthopterygii, os Ostariophysii e os Neoteleostei (BRUM, 1995). A super ordem Ostariophysii representa cerca de 25% de todas as espécies de teleósteos e 90% de toda a fauna de peixes neotropicais (BRUM e GALETTI Jr., 1997). Apresentam uma ampla distribuição mundial, com cinco ordens (Gymnotiformes, Gonorynchiformes, Characiformes, Cypriniformes e Siluriformes) contendo 63 famílias, aproximadamente 1.000 gêneros e 6.500 espécies (NELSON, *op. cit.*; BERRA, 2001), a maioria delas dulcícolas, constituindo cerca de 93% das espécies de peixes de água doce (BERRA, *op. cit.*). Exceto pelos Gonorynchiformes, todos os peixes ostariofísios possuem aparelho de Weber, que consiste em uma série de pequenos ossos que se estendem da bexiga natatória até o ouvido interno (BRIGGS, 2005). Enquanto os Gonorynchiformes (Anatophysii) vivem em sua maioria em ambientes estuarinos ou marinhos, os peixes possuidores do aparelho de Weber (Otophysii) são quase que exclusivamente de água doce (FINK e FINK, 1981; SAITOH *et al.*, 2003). Este aparato especializado permitiu uma recepção auditiva acurada que é um grande valor seletivo nestes ambientes (BRIGGS, 2005).

Os representantes da ordem Siluriformes são os mais diversos e amplamente distribuídos dentro do grupo Ostariophysi. São encontrados na América do Sul, América do Norte, Eurásia e África e representantes fósseis foram encontrados na Antártida (DE PINNA, 1998). Possuem 37 famílias reconhecidas (BETANCUR-R *et al.*, 2007) cerca de 416 gêneros e 2.584 espécies (TEUGELS, 1996). A maioria de seus representantes habita as águas doces das regiões tropicais, embora existam algumas famílias que apresentam espécies estuarinas, como Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae (DE PINNA, *op. cit.*) e duas famílias apomórficas que se adaptaram à água salgada, Plotosidae e Ariidae, e que se distribuíram mundialmente, ocupando lugares como Austrália, Madagascar e Índia Ocidental (BERRA, 2001).

Os Siluriformes podem ser facilmente identificados por possuírem características morfológicas distintas: corpo nu envolto por uma pele espessa ou coberto por placas ósseas; nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e da dorsal portador de um acúleo forte e pungente, o qual, muitas vezes produz toxina associada à glândula de veneno; presença de nadadeira adiposa geralmente bem desenvolvida e nadadeira caudal assumindo formatos variáveis e de um a quatro pares de barbilhões sensitivos (BRITSKI *et al.*, 1988; TEUGELS, 1996). Assumem tamanhos que variam de poucos milímetros (cerca de 10mm em alguns trichomycterídeos) a vários metros (5m em *Silurus glanis*), apresentam hábitos sedentários, sendo sua atividade predominantemente crepuscular ou noturna, quando utilizando-se de seus sentidos químicos (olfato e gustação) estes saem à procura de alimento, o qual é constituído principalmente por vermes e insetos (STERBA, 1973; disponível em <<http://www.tolweb.org/Siluriformes>>).

A família Ariidae possui 26 gêneros válidos com cerca de 133 espécies, 13 delas com representantes fósseis e 120 com distribuição circunglobal, habitando regiões litorâneas, estuarinas e rios de regiões tropicais e temperadas. A maioria das espécies ocorre em áreas costeiras pouco profundas e em estuários, com fundos lodosos ou arenosos. Espécies exclusivamente marinhas podem ser encontradas em profundidades superiores a 100 m, enquanto outras ocorrem somente em água doce. Característico dos bagres marinhos é o hábito apresentado pelos machos de incubar os ovos, que são carregados na cavidade bucal até o final

de seu desenvolvimento (AZEVEDO *et al.*, 1999; MARCENIUK, 2005; FERRARIS, 2007; MARCENIUK e MENEZES, 2007).

Os bagres marinhos, como são popularmente chamados os representantes desta família, são peixes de tamanho médio a grande (200-1200 mm de comprimento total); diferenciam-se dos outros siluriformes pelas seguintes características: cabeça com escudo cefálico conspícuo, coberto por pele fina na maioria das espécies ou por pele espessa e tecido muscular em outras; barbilhões maxilares e mentais geralmente presentes; aberturas nasais anterior e posterior bem próximas entre si, abertura posterior com uma válvula e sem barbilhões; olhos com a margem orbital livre ou coberta por pele; placas de dentes relacionadas ao vômer e placas acessórias geralmente presentes; dentes das placas relacionadas ao vômer e placas acessórias cônicas ou molariformes; acúleos das nadadeiras dorsal e peitorais bastante desenvolvidos; nadadeiras pélvicas com seis raios; nadadeira anal com 14 a 40 raios; nadadeira caudal furcada; linha lateral completa, posteriormente alcançando o lobo superior e/ou inferior da nadadeira caudal; escamas ausentes (MARCENIUK, 2005). No entanto, a forma e disposição das placas de dentes relacionadas ao vômer e das placas acessórias é a característica mais empregada na diagnose dos gêneros, mesmo com valores informativos reconhecidos como inconsistentes para este fim (MARCENIUK e MENEZES, 2007).

Os arídeos são largamente distribuídos ao longo da costa brasileira, apresentando grande importância econômica na Região Sul do país por sua contribuição nas pescarias artesanais (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978), além de desempenhar um papel relevante no equilíbrio trófico dos ecossistemas nestes locais (FAVARO *et al.*, 2005).

Comparado à maioria dos grupos de peixes marinhos, os peixes da família Ariidae possuem uma capacidade de dispersão limitada, ficando restritos às águas continentais devido não só ao seu desenvolvimento não pelágico, como também devido ao seu hábito reprodutivo especializado (BETANCUR-R *et al.*, 2007). Procuram a desembocadura dos rios e regiões lagunares na época da desova (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978) onde os machos, e raramente a fêmeas, realizam incubação oral carregando os ovos e formas iniciais da prole na cavidade bucal até que se complete todo o desenvolvimento embrionário. Possuem, portanto, uma tendência a serem estrategistas k, caracterizado por um grande esforço

reprodutivo onde maior parte da energia é direcionada para o processo de desova associado a cuidados parentais bem desenvolvidos (GOMES *et al.*, 1999).

Na costa brasileira são reconhecidas as seguintes espécies: *Arius rugispinis*, *Arius phrygiatus*, *Aspistor luniscutis*, *Aspistor parkeri*, *Bagre bagre*, *Bagre marinus*, *Cathorops agassizii*, *Cathorops arenatus*, *Cathorops spixii*, *Genidens barbatus*, *Genidens genidens*, *Genidens machadoi*, *Genidens planifrons*, *Notarius grandicassis*, *Potamarius grandoculis*, *Sciades couma*, *Sciades emphysetus*, *Sciades herzbergii*, *Sciades passany* e *Sciades proops* (MARCENIUK, 2005), sendo que no litoral paranaense levantamentos ictiofaunísticos realizados na Baía de Paranaguá e de Guaratuba, registraram as espécies *Genidens genidens*, *Cathorops spixii*, *Genidens barbatus* e *Aspistor luniscutis* (CHAVES e BOUCHEREAU, 1998; CHAVES e CORRÊA, 1998, QUEIROZ *et al.*, 2006 entre outros).

Cathorops spixii (SPIX e AGASSIZ, 1829) é encontrado na América do Sul, da Guiana Francesa à Região sul do Brasil, provavelmente no estado do Paraná, sendo bastante comum em regiões costeiras, estuários e rios costeiros. Possui comprimento máximo de cerca de 300 mm, sendo chamado comumente de Bagre-amarelo, Bagre-de-areia, Conguito, Iriceca. ***Genidens genidens*** (CUVIER, 1829), popularmente conhecido como bagre-urutu, possui comprimento máximo de aproximadamente 350 mm, ocorrendo em águas costeiras e regiões estuarinas apenas do Brasil, da Bahia ao Estado do Rio Grande do Sul. ***Aspistor luniscutis*** (VALENCIENNES, 1840) habita comumente águas costeiras e regiões estuarinas da América do Sul, da Guiana ao Estado do Paraná. Possui um comprimento máximo de 1200 mm e é popularmente chamado de Bagre-guri, Cangatá ou Guri-juba. ***Genidens barbatus*** (LACÉPÈDE, 1803), com comprimento máximo de 1200 mm está presente em águas costeiras, estuários e curso inferior de rios. Se distribui pela América do Sul, do Brasil, a partir do Estado do Rio de Janeiro, ao norte da Argentina, onde são denominados Bagre-branco, Bagre-ariaçu ou Bagre-do-mar (MARCENIUK, 2005).

1.3 ASPECTOS CARIOTÍPICOS E FILOGENÉTICOS

1.3.1 Aspectos Gerais

A utilização de dados cariotípicos para identificação de espécies (citotaxonomia) e para elaboração de padrões de relacionamento ou filogenias (citosistemática) foi inicialmente proposta por MATHEY (1949) no primeiro trabalho de revisão de dados cromossômicos de vertebrados.

A citogenética tenta estabelecer relação entre variáveis genéticas e demográficas, onde a partir de dados sobre o número diplóide ($2n$), o número fundamental (NF) e padrões de diversas técnicas de bandamento, se possam elaborar padrões de relacionamento ou filogenias, além da identificação de espécies e/ou possíveis vias de especiação (MATHEY, *op. cit.*).

A citogenética em peixes torna-se especialmente interessante porque estes animais constituem um grupo particular dentre os vertebrados pelo número de espécies, diversidade de formas, comportamento e habitats e pela posição basal que ocupam na evolução animal (OHNO, 1970).

Embora informações de diferentes espécies estejam cada vez mais disponíveis devido ao incremento das atividades de pesquisa neste campo, o conhecimento de cariótipos de peixes é ainda reduzido quando comparado ao de mamíferos e outros grupos de seres vivos. A dificuldade na análise dos cromossomos de peixes se deve, principalmente, ao seu reduzido tamanho e à falta de resolução de algumas técnicas de bandamento (BRUM, 1995).

A ictiofauna de águas continentais da região Neotropical apresenta aproximadamente 8.000 espécies (SCHAEFER, 1998) sendo que as pesquisas citogenéticas têm se restringido às espécies de água doce, com aproximadamente 1.045 espécies cariotipadas (disponível em <<http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>>), e poucos relatos de peixes marinhos, com aproximadamente 120 espécies, distribuídas em 43 famílias e 80 gêneros (BRUM, 1996; BRUM *et al.*, 2001; DA SILVA CORTINHAS *et al.*, 2003; CIPRIANO, 2005; disponível em <<http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Marine%20Neotropical%20fishes.pdf>>).

Nas espécies estudadas até o momento, encontrou-se uma quantidade diversa no número diplóide, variando de $2n=12$ em *Gonostoma bathyphylum* a

$2n=446$ em *Diptychus dipogon* (JIANXUN *et al.*, 1991; KLINKHARDT *et al.*, 1995) e fórmulas cromossômicas.

Apesar desta ampla variedade de número e fórmula cariotípica nos peixes, verifica-se uma concentração maior em torno de $2n=48$, com muitos cromossomos acrocêntricos e poucos metacêntricos (BRUM, 1995). OHNO (1970) considera o cariótipo com 48 cromossomos acrocêntricos o primitivo dos peixes teleósteos e uma herança dos primeiros vertebrados. A poliploidização do genoma deste vertebrado ancestral é considerado por OHNO e ATKIN (1966) como o mais importante evento na evolução dos vertebrados. Os Euteleostei teriam herdado e conservado este cariótipo primitivo principalmente em suas formas marinhas, enquanto nos grupos típicos de água doce, como os Ostariophysi, ele foi se tornando mais derivado, com uma maior variabilidade no número diplóide (ampliados de acordo com o grupo para 50, 52, 54, 58, 100, etc) e na composição cromossômica (OLIVEIRA *et al.*, 1988; CHOUDHURY, PRASAD e DAS, 1993).

Um complemento diplóide de $2n=50$ cromossomos tende a prevalecer entre os Ostariophysi, principalmente entre os Otophysi, cujo número fundamental, no entanto, é superior a 50, refletindo a presença de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos no cariótipo de muitas espécies deste grupo (OLIVEIRA *et al.*, 1988; CHOUDHURY, PRASAD e DAS, 1993; BRUM, 1995;).

1.3.2 Técnicas Citogenéticas e Citomoleculares

Os principais estudos realizados pela citogenética de peixes têm sido feitos através de técnicas convencionais, como coloração Giemsa, bandamento C (banda-CBG) e impregnação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (Ag-RONs) uma vez que bandamentos longitudinais, tipo bandamento G (banda-GTG), não são tão fáceis de se obter em cromossomos de peixes (ARTONI *et al.*, 2000), possivelmente devido ao tamanho reduzido e ao grau de compartimentalização diferenciado de seus cromossomos (GOLD *et al.*, 1990).

Através do bandamento C, há uma remoção diferencial de DNA na região eucromática após tratamento com ácido, base e solução salina, enquanto que a região mais condensada permanece relativamente intacta e detectável (SUMNER, 1972), provavelmente resultado da associação de proteínas com o DNA desta região dificultando o desgaste da mesma (JACK *et al.*, 1985). Em geral, a heterocromatina é

definida como um segmento do cromossomo que se apresenta condensado, com pouca ou nenhuma atividade transcricional, composto de DNA altamente repetitivo, que se replica tardiamente na fase S da interfase e manifesta heteropiconose positiva ou negativa se submetida a determinados tratamentos. Embora genérica, esta definição apresenta exceções em cada um de seus itens. Mudanças relacionadas com quantidade e distribuição de heterocromatina nos cromossomos têm sido relatadas como mecanismo de evolução cariotípica em alguns grupos de peixes (ARTONI *et al.*, 1999; MARGARIDO e GALETTI Jr., 2000). Devido à sua composição, a heterocromatina poderia sofrer mais facilmente alterações, as quais determinariam e favoreceriam rearranjos cromossômicos (WICHMAN *et al.*, 1991), além da presença de blocos poderem alterar a expressão gênica de seqüências vizinhas através do efeito de posição (PARDUE e HENNING, 1990). A técnica da banda C em peixes tem sido o método mais utilizado para estudo das regiões heterocromáticas, constituindo-se numa importante ferramenta na caracterização de populações e/ou indivíduos, detecção de polimorfismos estruturais, diferenciação de cromossomos Bs e cromossomos sexuais (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). Fluorocromos, enzimas de restrição e a utilização de hibridação *in situ* com sondas de DNA satélite também têm sido empregados para tal fim.

As Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) têm sido evidenciadas comumente através da técnica de impregnação por nitrato de prata, que permite localizar sítios ativos de genes ribossomais nos cromossomos (HOWELL e BLACK, 1980). A presença de uma proteína acídica (nucleolina) nas RONs ativas na intérfase anterior à mitose na qual a célula sofreu fixação, parece ser responsável pela coloração com nitrato de prata e na sua conseqüente identificação (HSU *et al.*, 1975). Assim, esta técnica pode ser considerada como método indireto de localização das RONs, uma vez que não há associação entre o nitrato de prata e os rDNA propriamente ditos.

A caracterização do número e posição das RONs tem sido muito utilizada em peixes e pode constituir um excelente marcador citotaxonômico para alguns grupos (AFFONSO, 2000), podendo variar de modo inter e intra-específico ou inter e intra-individual quanto ao número, localização, intensidade e tamanho (GOODPASTURE e BLOOM, 1975).

Devido às dificuldades em se obter bons padrões de bandamento G e C em algumas espécies de peixes, possivelmente devido à peculiaridades da estrutura e

compactação de seu DNA (MEDRANO *et al.*, 1988 apud SOLA *et al.*, 1993), têm-se utilizado técnicas alternativas, como enzimas de restrição (ER) que caracterizam-se pela habilidade de reconhecer seqüências específicas no DNA e orientar seu corte. Elas induzem alterações estruturais nos cromossomos metafásicos relacionados a características estruturais específicas de bandamentos cromossomos, refletindo uma distribuição de seqüências diferentes de DNA nos cromossomos (FERNANDEZ *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 1999). Os padrões obtidos dependem da espécie e enzima utilizados.

Estas técnicas são capazes de caracterizar regiões cromossômicas, facilitando a discriminação entre cariótipos aparentemente similares e revelando mecanismos de rearranjos, sendo úteis na identificação de marcadores para espécies e/ou populações e no estabelecimento de homeologias (OZOUF-COSTAZ e FORESTI, 1992).

Recentemente, métodos mais apurados utilizando corantes fluorescentes e hibridação *in situ* têm se mostrado ferramentas importantes para o entendimento da composição e estrutura dos cromossomos.

A utilização de fluorocromos base-específicos, como Cromomicina A₃, Mitramicina, Quinacrina, DAPI entre outros, permite identificar regiões ricas em bases AT ou GC, dependendo de sua especificidade. Assim, segmentos cromossômicos repetitivos ou moderadamente repetitivos como heterocromatina e RON, têm sido investigados com maior confiabilidade. Em algumas espécies de peixes, este método tem mostrado diferenças qualitativas entre as heterocromatinas do complemento cromossômico (MARGARIDO e GALETTI Jr., 2000) e na maioria dos teleósteos nota-se uma relação entre os fluorocromos GC específicos e as RONS, devido a ocorrência de altos conteúdos de bases GC nas regiões espaçadoras dos genes ribossomais ou entre seqüências de DNA repetitivos adjacentes (AMEMIYA e GOLD, 1986; PENDÁS *et al.*, 1993). No entanto, deve-se ter cautela em afirmar tal consideração, já que tais fluorocromos podem revelar sítios adicionais não relacionados aos clusters ribossomais (ARTONI *et al.*, 1999; GALETTI Jr. e MARTINS, 2004).

A Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) consiste na incorporação de uma sonda ao DNA da espécie em estudo, a qual possui uma seqüência específica de nucleotídeos e que posteriormente é evidenciada pela aplicação de um corante fluorescente, constituindo assim um método mais sensível que a marcação pela

prata e/ou fluorocromos na detecção de sítios contendo seqüências de genes ribossomais. Estes genes, nos eucariotos, estão organizados em duas famílias multigênicas: a) rDNA 45S, que codifica os rRNA 18S, 5,8S e 26S/28S, e b) rDNA 5S que codifica o rRNA 5S, um dos componentes da subunidade maior dos ribossomos. As seqüências formadoras das RONS são detectadas através de sondas de DNA 18S e 28S, e pela sonda 5S são detectados os sítios genômicos do rDNA 5S que consistem em seqüências codificantes de 120pb separadas umas das outras por DNA espaçador não transcrito (NTS) (GALETTI Jr. e MARTINS, 2004) e parecem seguir um mecanismo de evolução independente dos sítios 45S de rDNA (MARTINS e GALETTI Jr., 1999). É sugerido que tais diferenças funcionais entre esses genes, resultariam na necessidade de uma diferente localização destes, de forma que as seqüências conservadas poderiam ser então mantidas, evitando interferências na função gênica, uma vez que a ocorrência de translocações entre os genes rRNA 5S e os demais rDNAs seria dificultada (MARTINS e GALETTI Jr., *op. cit.*).

Assim sendo, importantes subsídios têm sido fornecidos pela Citogenética Clássica e Molecular de Peixes, para um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, podendo ser considerada uma excelente ferramenta para ser utilizada em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e genética molecular, para se chegar mais próximo a uma real história evolutiva dos organismos (ARTONI *et al.*, 2000).

1.3.3 Aspectos Sistemáticos e Citogenéticos em Siluriformes

Os Siluriformes apresentam vários problemas de ordem sistemática e taxonômica, principalmente com relação às espécies neotropicais, dado o elevado número de espécies, sua ampla distribuição geográfica e a semelhança morfológica existente entre muitas espécies.

Sua relação filogenética com os outros grupos pertencentes à super ordem Ostariophysi ainda permanece obscura. Entre os estudos recentes há um consenso de que Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes formariam um clado denominado Characiphsi, sendo este grupo irmão dos Cypriniformes (FINK e FINK, 1981; SAITOH *et al.*, 2003; BRIGGS, 2005; SULLIVAN *et al.*, 2006) (FIGURA 02).

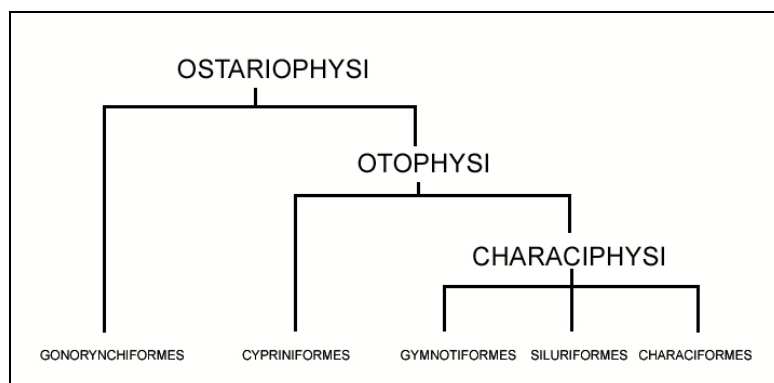


FIGURA 02 - RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DOS OSTARIOPHYSI MODIFICADO DE FINK E FINK (1981)

Independentemente das relações envolvidas, não há dúvida sobre a monofilia dos Siluriformes, como indicado por várias sinapomorfias morfológicas encontradas (FINK e FINK, 1981; ARRATIA *et al.*, 2003) e confirmado por estudos filogenéticos baseados em seqüências gênicas nucleares feitos por SULLIVAN *et al.* (2006).

As análises das relações e posições filogenéticas internas dos Siluriformes revelaram alguns pontos de consenso geral, principalmente no que se refere a posição basal de Diplomystidae em relação aos demais Siluriformes (FINK e FINK, 1981; ARRATIA, 1987; DE PINNA, 1998, MARCENIUK, 2003). A monofilia de 25 famílias, incluindo Ariidae, pertencentes à ordem Siluriformes também foi confirmada pelos estudos moleculares de SULLIVAN *et al.* (2006).

Siluriformes têm um importante papel na biogeografia histórica. Seu padrão de distribuição global providencia evidências do modelamento geográfico da terra e de sistemas aquáticos. Acredita-se que os Siluriformes foram primariamente habitantes de água doce e que realizaram significantes migrações marinhas (BRIGGS, 2005), sendo esta uma propensão filogenética da ordem, pelo menos de um dos seus ramos principais (BETANCUR-R, 2003). As duas famílias marinhas são, portanto, provavelmente derivadas de ancestrais de água doce e apresentam seu próprio padrão biogeográfico (BERRA, 2001).

Quanto à evolução cromossômica, também há grandes dificuldades em se estabelecer um padrão para os Siluriformes, considerando a extensa variabilidade cariotípica predominante tanto em nível de famílias, quanto de gêneros, além da não determinação acurada de seu cariótipo primitivo.

LEGRANDE (1981), baseado em informações citogenéticas achadas em Ictaluridae, propôs um cariótipo basal de $2n=58$ com um número fundamental relativamente alto (>80). No entanto, baseado no número diplóide conservado da família Diplomystidae, e considerando esta a mais primitiva dentre os Siluriformes (FINK e FINK, 1981; ARRATIA, 1987; DE PINNA, 1998). OLIVEIRA e GOSZTONYI (2000) sugeriram que um $2n=56$ poderia ser o cariótipo ancestral e uma sinapomorfia desta ordem. Um alto valor de NF, característico da ordem Siluriformes (STOLF *et al.*, 2004) e também observado em Characiformes e Gymnotiformes, é proposto por OLIVEIRA e GOSZTONYI (2000) como uma condição plesiomórfica amplamente distribuída neste grupo.

Estudos cromossômicos em Siluriformes tiveram início somente a partir das últimas três décadas. Apesar disso, em comparação com os outros grupos de peixes, são bem representados citogeneticamente com cerca de 321 (aproximadamente 13%) espécies cariotipadas (OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000) sendo estas pertencentes em sua maioria às famílias Bagridae, Callichthyidae, Ictaluridae e Siluridae (CHOUDHURY, PRASAD e DAS, 1993).

Do total de espécies de Siluriformes já cariotipadas, cerca de 45,7% possuem um número diplóide relativamente conservado de $2n= 56\pm 2$ (Figura 03). OLIVEIRA e GOSZTONYI (2000) propõem que este conservadorismo, mesmo em um grupo com grande número de espécies e com uma ampla variedade de tamanho e estrutura populacional, se deve a uma melhor condição para a manutenção celular nestes organismos. Por outro lado, várias famílias como Loricariidae e Callichthyidae apresentam uma ampla variedade no número cromossômico, sugerindo histórias evolutivas diferentes, com mudanças cromossômicas freqüentemente associadas com processo de especiação neste grupo (LEGRANDE, 1981; OLIVEIRA *et al.*, 1988; BRUM, 1995; BRUM e GALETTI Jr., 1997; ARTONI e BERTOLLO, 2001).

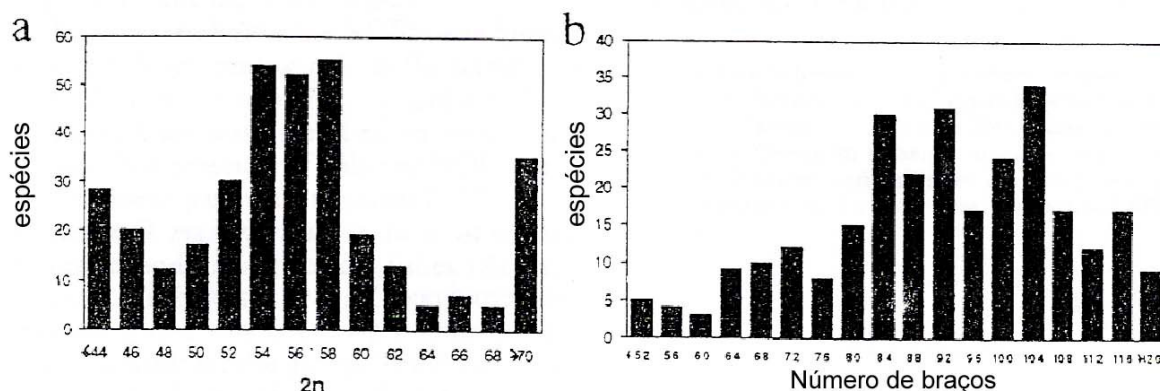


FIGURA 03 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DIPLÓIDE (a) E NÚMERO DE BRAÇOS CROMOSSÔMICOS (b) ENTRE OS SILURIFORMES (RETIRADO DE OLIVEIRA E GOSZTONYI, 2000)

Não há uma tendência definida quanto ao incremento ou redução do número de cromossomos de dois braços entre os Siluriformes (FENOCCHIO *et al.*, 2003). BRUM (1995) propõe, baseado na alta frequência de números diplóides maiores que 58, que eventos de especiação entre Siluriformes foram relacionados a um incremento no número cromossômico. Alguns autores, no entanto, sugerem que a redução do número diplóide é melhor compreendido entre as linhas evolutivas e que rearranjos cromossômicos que não alteram o número diplóide são fixados mais frequentemente (GARCIA-MOLINA e URIBE-ALCOCER, 1988; OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000).

1.3.3.1 Família Ariidae

Muitos trabalhos sobre sistemática e taxonomia da família têm sido realizados. No entanto, o estado atual de conhecimento é insatisfatório devido à ausência de dados que possibilitem a determinação dos táxons incluídos. Isto pode ser explicado pela: similaridade existente entre muitos dos exemplares, dificultando a identificação correta das espécies; a grande diversidade e ampla distribuição geográfica das espécies, impedindo a obtenção de material representativo de todos os gêneros nominais, alguns raros em coleções zoológicas; os poucos trabalhos disponíveis sendo as análises limitadas a um número restrito de complexos anatômicos e espécies representativas de poucos gêneros (MARCENIUK, 2003).

Apesar de todos os problemas nomenclaturais, a monofilia da família é bem suportada por evidências morfológicas (DIOGO, 2004; MARCENIUK, 2003) e

moleculares (BETANCUR-R, 2003; SULLIVAN *et al.*, 2006; BETANCUR-R *et al.*, 2007). A família Ariidae pertence ao agrupamento monofilético Ariida, composto também pelas famílias Schilbeidae, Pangasidae, Claroteidae e o gênero *Ancharius*. A família Claroteidae é considerada o grupo irmão de Ariidae e *Ancharius* (MARCENIUK, 2003).

Poucos estudos a respeito do monofiletismo e das relações de parentesco entre os gêneros e espécies da família têm sido realizados. MARCENIUK (2003) divide a família em três subgrupos monofiléticos muito bem corroborados por uma série de sinapomorfias, as subfamílias Galeichthinae, Bagrinae e Ariinae. A subfamília Galeichthinae, inclui somente o gênero *Galeichthys*, que é inquestionavelmente o agrupamento mais basal dentro da família e respectivamente o grupo irmão de todos os demais gêneros da família. A monofilia do clado que inclui as subfamílias Bagrinae e Ariinae, é fortemente corroborada por 20 sinapomorfias.

A família Ariidae é a única com representantes marinhos dentro da ordem Siluriformes que se distribuíram por todos os continentes. Considerando esta sua ampla distribuição nas costas tropicais e sua suposta impossibilidade de dispersão em águas oceânicas, é provável que os arídeos tenham se diversificado e dispersado pelo mar de Tethys durante o Cretáceo, há aproximadamente 100 milhões de anos (BETANCUR-R, 2003; BETANCUR-R *et al.*, 2007). A invasão das águas marinhas é uma situação aparentemente atípica em outros organismos aquáticos, podendo ser um indício de respostas compartilhadas a eventos históricos, implicando vicariância e isolamento de alguns taxons, por exemplo, por flutuações ocorridas ao nível do mar, facilitando a adaptação fisiológica de seus representantes.

Quanto ao seu padrão cromossômico, poucas inferências podem ser feitas sobre a família Ariidae, uma vez que os estudos realizados são mínimos (Tabela 01).

OLIVEIRA *et al.* (1988) e MOLINA *et al.* (2004) baseado nos estudos realizados até o momento nas espécies marinhas, onde a principal variação que ocorre é no número de braços cromossômicos (NF), sugerem que isto poderia refletir a história evolutiva do grupo, considerando a hipótese de que os Siluriformes são primeiramente um grupo de água doce, assim apresentando características de diversificação destas espécies neste tipo de ambiente.

Os representantes da família Ariidae cariotipadas até o momento, apresentam um número diplóide relativamente conservado, como mostrado pela grande maioria dos Siluriformes ($2n= 56\pm 2$) (Tabela 1). ROBERTS (1964) apud GARCIA-MOLINA e URIBE-ALCOCER (1988) propõem que os arídeos mais primitivos apresentam um alto número cromossômico, principalmente do tipo acrocêntrico, e os arídeos mais derivados mostram uma tendência à diminuição desse número, aumentando assim o número de cromossomos de dois braços.

TABELA 01- DADOS CITOGENÉTICOS DE PEIXES PERTENCENTES À FAMÍLIA ARIIDAE

Espécie	2n	Cariótipo				NF	Crom Sex.	Local	Referência
		m	sm	st	a				
<i>Galeichthys caerulescens</i>	52	16	24	10	02	102	-	Tres Palos, Guerrero, México	Arreguin, 1983
<i>Arius dussumieri</i>	54	12	18	12	12	84	-	Oceano Indico	Rishi, Singh e Haobam, 1983
<i>Arius melanopus</i>	52	16	30	06	-	104	-	Golfo do México	Ramirez, 1985
<i>Arius felis</i>	54	-	26	28	-	80	-	Golfo do México	LeGrande, 1980
	54	16	12	20	06	102	-	Campeche, México	Garcia-Molina e Uribe-Alcocer, 1988
<i>Bagre marinus</i>	54	12	08	34	-	74	-	Nordeste do Golfo do México	Fitzsimons, Legrande e Korth, 1988
<i>Bagre bagre</i>	56	24	26	06	-	106	-	Cananéia, SP, Brasil	Gomes, Phan e Passos, 1990
<i>Cathorops sp.</i>	54	13	13	28	-	80	-	Cananéia, SP, Brasil	Gomes, Phan e Passos, 1992
<i>Arius nenga</i>	54	16	36	02	-	108	-	Mar Gopalpur, Orissa, Índia	Choudhury, Prasad e Das, 1993
<i>Arius serratus</i>	56	08	24	24	-	112	-	Mar Gopalpur, Orissa, Índia	Choudhury, Prasad e Das, 1993
<i>Genidens genidens</i>	56	12	20	20	04	88	-	Cananéia, SP, Brasil	Gomes, Phan e Passos, 1994
<i>Netuma barba</i> ≡ <i>Genidens barbatus</i>	56	18	18	18	02	92	XX/XY	Cananéia, SP, Brasil	Gomes, Phan e Passos, 1994
<i>Arius parkeri</i> ≡ <i>Aspistor luniscutis</i>	56	16	16	22	02	88	-	Cananéia, SP, Brasil	Gomes, Phan e Passos, 1994
<i>Hexanematichthys herbergii</i>	56	24	24	06	02	104	-	Lago de Maracaibo, Venezuela	Molina <i>et al.</i> , 2004

Nota: Os números fundamentais foram retirados dos respectivos trabalhos sem quaisquer modificações. Portanto apresentam divergências (cromossomos subtelocêntricos como portadores de um único braço ou de dois braços) quanto ao cálculo do mesmo

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao escasso conhecimento a respeito das características biológicas gerais e citogenéticas dos peixes da costa brasileira, esta dissertação visa ampliar os conhecimentos cariotípicos em peixes marinhos, destacando aqui os do litoral paranaense, com enfoque em representantes da família Ariidae. Isto faz com que especial interesse seja direcionado para as espécies *Genidens genidens*, *Genidens barbatus*, *Aspistor luniscutis* e *Cathorops spixii* devido a sua grande importância econômica na Região Sul do país. Este trabalho, além de fornecer dados básicos que poderão ser utilizados em estudos de distribuição geográfica, taxonomia e evolução. Poderá contribuir, eventualmente, em aspectos aplicados relacionados à pesca, reprodução, melhoramento genético e monitoramento ambiental.

3 OBJETIVOS

Pretende-se, com a caracterização citogenética de espécies pertencentes à família Ariidae, reunir dados, muitos dos quais ainda inéditos, sobre o padrão cromossômico deste grupo, e correlacioná-los com estudos citogenéticos já realizados, procurando compreender melhor os processos de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica, podendo se chegar mais próximo a uma real história evolutiva do grupo como um todo.

Para tanto, foram propostas:

- a) Determinar o número diplóide ($2n$) e número fundamental (NF) dos exemplares;
- b) Localizar as duas famílias multigênicas ribossomais através da impregnação por nitrato de prata (Ag-RONs) e por hibridação fluorescente *in situ* (FISH);
- c) Analisar a distribuição da heterocromatina constitutiva através de bandamento C e utilização de enzima de restrição;
- d) Investigar a natureza das heterocromatinas através do emprego de fluorocromos AT e GC específicos;
- e) Comparar os padrões encontrados nestas espécies, através das técnicas acima citadas, observando a existência ou não de variações a nível individual, populacional e específico e em relação a outros Siluriformes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram analisados 21 exemplares de *Genidens genidens*, sendo 09 (6♂, 3♀) (Figura 04a) provenientes da Baía de Antonina (Figura 05a) e 12 (5♂, 7♀) do Pontal do Paraná (Figura 05b2); 14 exemplares de *Aspistor luniscutis* (Figura 04b), sendo 04 (todos ♂) provenientes da Ilha do Mel (Figura 05b1) e 10 (8♀, 2♂) da Baía de Guaratuba (Figura 05c) e 11 exemplares de *G. barbus* (Figura 04c) (todos ♂) pertencentes a Baía de Guaratuba (Figura 05c).

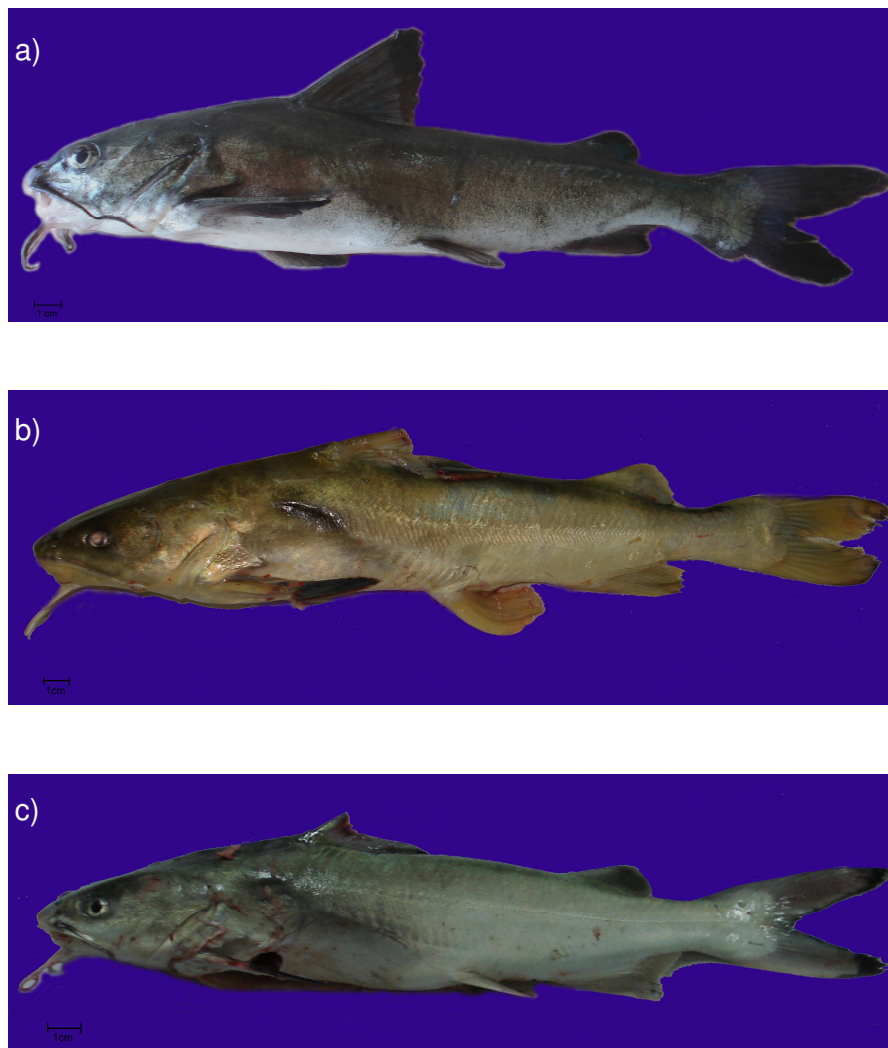


FIGURA 04 – EXEMPLARES DAS ESPÉCIES *G. genidens* (a), *A. luniscutis* (b) E *G. barbus* (c) COM 30 cm, 36,4 cm E 28 cm DE COMPRIMENTO TOTAL, RESPECTIVAMENTE

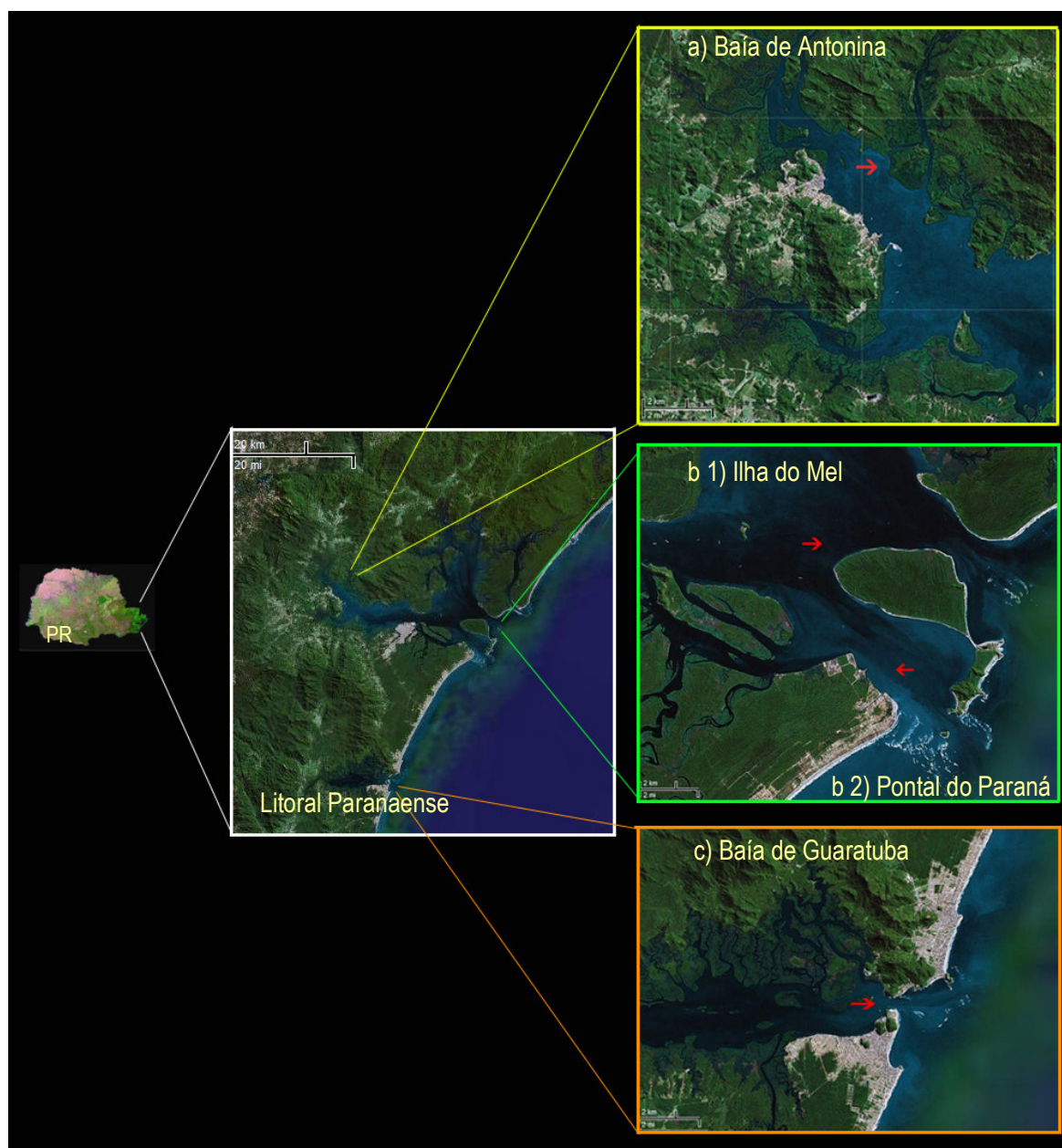


FIGURA 05 - LOCAIS DE COLETA

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Das coletas

Os peixes foram capturados com rede de porta de 1,5cm entre nós ou caniço, em seguida acondicionados em caixas de isopor com água do próprio local da coleta e aeradores. Em seguida transportados até ao Laboratório de Citogenética Animal (Setor de Ciências Biológicas - UFPR), onde foram eutanasiados e protocolados.

4.2.2 Da obtenção de metáfases mitóticas

Foi empregada a técnica de cultura de tecidos sólidos de curto tempo descrita por FENOCCHIO *et al.* (1991) com algumas modificações como segue:

- Retirar as porções anterior e posterior do rim (aproximadamente 3 mm³) e transferir para uma placa de Petri contendo 5 ml de meio de cultura (RPMI + 20% de soro bovino fetal + antibiótico e antimicótico);
- Desagregar o tecido com pinças de ponta fina com posterior aspersão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha. Incubar a solução com células em estufa a 29°C por 8 horas. 1h30min antes de completar o tempo, pingar 150 µL de colchicina (0,025%) em cada recipiente. Agitar gentilmente a placa de Petri para que a solução de colchicina se homogeneíze a aquela da placa. Manter a nova solução em estufa até o tempo final da cultura;
- Passado este tempo, transferir a cultura para um tubo de ensaio e centrifugar a 800-900 rpm por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e completar o tubo até 8ml com solução hipotônica de KCl (0,075M). Desagregar o botão celular na solução por suspensão e mantê-lo 40 minutos em estufa a 37°C;
- Preparar o fixador com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e manter sob refrigeração a 4°C. Dado o tempo da hipotonização, ressuspender o material até ficar homogêneo, e centrifugar a 800-900 rpm por 10 minutos;

- Descartar o sobrenadante e em seguida completar o tubo com fixador até o volume de 8 ml. Novamente ressuspender o botão celular e centrifugar a solução a 800-900 rpm durante 10 minutos;
- Repetir a etapa anterior duas vezes;
- Descartar o sobrenadante, colocar 1,5 ml de fixador e ressuspender o botão celular. Armazenar a solução em tubo tipo Eppendorf em freezer à -20°C.

4.2.3 Método da coloração convencional- Giemsa

Gotejar sobre uma lâmina limpa, aquecida ao redor de 45°C, a suspensão celular armazenada no freezer. Corar a lâmina com uma solução de Giemsa à 5% em tampão fosfato (pH 6,8) durante um período de 10 minutos e em seguida lavá-la em água corrente e deixar secar ao ar.

4.2.4 Detecção das Regiões de Heterocromatina (Banda C)

Utilizada a técnica descrita por SUMNER (1972), com pequenas modificações segundo VICENTE (1994):

- Levar a lâmina após ter sido gotejada com a suspensão celular à estufa de 45°C por um dia;
- Transcorrido este tempo, colocá-la em solução de HCl 0,2 N à 42°C durante 10 minutos. Em seguida lavá-la com água destilada e deixar secar ao ar;
- Colocar a lâmina em solução de Hidróxido de Bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 45°C por aproximadamente 2 minutos;
- Inserir rapidamente a lâmina no HCl 0,2 N para retirar o excesso de bário e após isso lavar com um jato de água destilada. Em seguida colocá-la em uma solução de 2xSSC (15,53 g de NaCl + 8,82 g de Citrato Trissódico + Água deionizada) durante uma hora à 60°C;
- Decorrido este tempo lavar a lâmina em água destilada e deixar secar ao ar;
- Corar a lâmina com Giemsa diluída a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos.

4.2.5 Caracterização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-RONs)

A técnica utilizada foi descrita por HOWELL e BLACK (1980). As RONS ativas foram visualizadas após coloração com solução aquosa de nitrato de prata como segue:

- Pingar as lâminas conforme descrito anteriormente e deixá-las envelhecer por 1 dia em estufa à aproximadamente 45°C;
- Utilizar uma solução aquosa de nitrato de prata a 50% (1g de AgNO₃ em 2ml de H₂O destilada) e uma solução aquosa de gelatina a 2% (1g de gelatina em 50ml de H₂O destilada, acrescentando-se 0,5ml de ácido fórmico). Condicionar esta última em frasco âmbar e mantê-la em geladeira;
- Pingar sobre a lâmina 150µL de solução aquosa de gelatina e 300µL de solução aquosa de AgNO₃, misturar gentilmente e cobrir com uma lamínula. Levá-la a estufa a 60°C. Quando o material adquirir uma coloração dourado-acastanhada, retirar a lâmina da estufa e remover a lamínula com um jato de água destilada e deixar secar ao ar.

4.2.6 Dupla Coloração CMA₃/DAPI

Foi empregada a técnica de SCHWEIZER *et al.* (1976) com adaptações:

- Colocar 80µl de solução de Cromomicina A₃ sobre a lâmina recém preparada para observação de cromossomos e cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora no escuro;
- Escorrer a lamínula e lavar com água corrente e secar levemente;
- Colocar 80µl de solução DAPI/Antifading, retirar o excesso com papel filtro.

4.2.7 Clivagem com Endonuclease de Restrição

A técnica utilizada foi a descrita por MEZZANOTTE *et al.* (1983), com algumas adaptações feitas por MAISTRO (1996) para as preparações com cromossomos de peixes.

- Pingar uma lâmina em banho-maria a 60° C e levar à estufa a 45°C para envelhecer por um dia;

- Pingar uma gota de solução de enzima (27 µL de água destilada+3 µL de tampão+ 0,9 µL de *Alu* I [5' AG/CT 3'] com concentração de 10 U/µL) para cada gota de suspensão celular e cobrir com lamínula;
- Colocar a lâmina em câmara úmida muito bem fechada e incubada à 37°C por cinco horas;
- Transcorrido o tempo necessário, remover a lamínula com um jato de água destilada e deixar secar ao ar;
- Corar a lâmina com solução de Giemsa (5%) em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos;
- Lavar a lâmina novamente em água destilada e deixar secar ao ar.

4.2.8 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas rDNA 18S e 5S

A metodologia empregada seguiu PINKEL *et al.* (1986) com algumas modificações:

- Preparação das sondas

A sonda de DNA ribossômico do fragmento 18S (cerca de 1800pb) foi obtida a partir de amplificação por polimerização em cadeia (PCR) dessa sequência do DNA genômico do peixe *Prochilodus argenteus* (HATANAKA e GALETTI Jr., 2004). A sonda de rDNA 5S (cerca de 120 pb), através de um plasmídeo recombinante contendo o gene rRNA 5S obtido de *Leporinus* (MARTINS e GALETTI Jr., 1999).

Para a amplificação, foram utilizados 100 ng de DNA molde + 10 ng do “primer”, juntamente com KCl 50 mM + Tris pH 8,3 10 mM + MgCl₂ 1,5 mM + dNTPs (200 mM cada) + 2,5U de *Taq* polimerase e água MilliQ q.s.p. 50 µl.

- Marcação das sondas

Foi utilizado marcação indireta por meio da reação de “Nick Translation” (BioNick Labeling System – Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante empregando-se Streptavidina Invitrogen. A solução de hibridação consistiu de 200 µl Formamida (50% de Formamida); 80 µl Sulfato de Dextrano 50% (concentração final de 10%); 40 µl de 20xSSC (concentração final 2xSSC); 80 µl de H₂O q.s.p., perfazendo um volume total de 400µl, aos quais foram adicionados 1,5 µg de sonda (DNA marcado com biotina). Em seguida, a solução de hibridação foi transferida para um banho fervente, durante 10 minutos, para denaturação do DNA e,

imediatamente após, para um recipiente com gelo, impedindo a renaturação por choque térmico.

- Preparação das lâminas

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS, por 5 minutos. Em seguida, foram tratadas com pepsina 0,005% em 10 mM de HCl, por 10 minutos a 37°C e lavadas em PBS à temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x/ MgCl₂ 50 mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com 90µl de formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

- Hibridação e detecção dos sinais correspondentes

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo “overnight” a 37°C, em câmara úmida contendo solução de formamida 60% em 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 50% em 2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas com 0,1xSSC a 60°C, por 15 minutos. Em seguida foram lavadas em Tween 20, por 5 minutos, incubação em 90 µl de tampão NFDM a 5%, por 15 minutos em câmara úmida e duas lavagens com Tween 20, cinco minutos cada. Para a detecção da sonda marcada com biotina, foram colocados sobre as lâminas 90µl de Streptavidina Invitrogen (1:500 em NFDM) durante uma hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em Tween 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então corados com iodeto de propídio + antifading (proporção de 200 µL de antifading com 8 µL de iodeto de propídeo concentrado em 50 µg/mL). A análise realizada em fotomicroscópio de epifluorescência sob filtro azul (450-490 nm de comprimento de onda).

4.2.9 Fotomicrografia

As metáfases que apresentaram melhor dispersão, condensação e morfologia cromossômica foram capturadas através do sistema de captura digital de imagens, com microscópio Carl Zeiss Axiophot acoplado a este o sistema Applied Spectral Image. As análises cromossômicas foram realizadas no computador através do software Case Data Manager Expo 2.0.

4.2.10 Identificação dos cromossomos e montagem dos cariótipos

As medições cromossômicas foram feitas através do software Adobe Photoshop 7.0. A classificação dos cromossomos conforme os valores da relação de braços (RB) foi estabelecida segundo LEVAN, FREGDA e SANDBERG (1964) em: metacêntricos (m) RB= 1,00 a 1,70; submetacêntricos (sm) RB= 1,71 a 3,00; subtelocêntricos (st) RB= 3,01 a 7,00; acrocêntricos (a) RB= maior do que 7,01. Para o cálculo do número fundamental (NF) os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos foram considerados de dois braços, enquanto que os acrocêntricos constituídos por um único braço.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Existem aproximadamente 13.000 espécies de peixes marinhos (NELSON,1994) e pouco menos de 2% têm sido estudados citogeneticamente (BRUM,1996). A maioria possui um número diplóide de 48 cromossomos acrocêntricos, levando muitos autores a sugerirem falta de barreiras no ambiente marinho, além da alta mobilidade destes grupos para explicar tal conservadorismo. No entanto, mesmo considerando o mesmo taxa, espécies relacionadas tem mostrado mudanças em sua fórmula e número cariotípico. O número diplóide no ambiente marinho varia de $2n=22-26$ em algumas espécies de Nototheniidae (OZOUF-COSTAZ *et al.*, 1997) um grupo de peixes antárticos, a $2n=240-260$ em alguns Acipenseridae anádromos, com vários microcromossomos (FONTANA *et al.*, 1997).

O sistema marinho exhibe uma aparente homogeneidade e continuidade, e reconhecer barreiras que dificultem a dispersão da biota é uma atividade extremamente complexa, especialmente quando se considera a participação de fatores dinâmicos como correntes e ventos (MOLINA e GALETTI Jr., 2004). Situação oposta é observada em ambientes aquáticos continentais, nos quais as unidades básicas de estudos (bacias hidrográficas) são nitidamente delimitadas por acidentes físicos.

Esta situação de um aparente *continuum* marinho ao longo da costa reflete-se, dentre outros aspectos, na aceitação de uma ampla distribuição de diversas espécies, não suscitando a análise exploratória do real *status* taxonômico de muitas das *taxa* de peixes marinhos ocorrentes ao longo da costa brasileira (BIZERRIL e COSTA, 2001).

A coexistência em elevada abundância de peixes assemelhados em estuários tropicais, onde o espaço ou os nichos tróficos são normalmente limitados, pode ocorrer devido ao desenvolvimento de estratégias que resultem na utilização diferenciada do ambiente por tais espécies, que por apresentarem grande coincidência nas estruturas morfológicas podem indicar uma competição, acarretando exclusão das espécies de menor adaptação. Portanto, as espécies aparentadas que vivem na mesma área, em geral, desenvolvem relações interespecíficas, exploram distintos habitats (utilização espacial do ambiente) ou são

ativas em tempos diferentes (utilização temporal do ambiente) (MARGALEF, 1977; AZEVEDO *et al.*, 1999).

Os bagres marinhos, em geral, apresentam habitats nitidamente separados, ocorrendo em áreas de profundidades e salinidades diferentes. Formas juvenis das espécies *G. barbus*, *B. bagre* e *B. marinus* concentram-se em salinidades mais elevadas, provavelmente devido aos adultos dessas espécies viverem em mar aberto. Já *G. genidens*, *C. spixii* e *A. luniscutis* ocorrem em amplas variações de salinidade e em áreas de profundidades diferentes: *G. genidens* é encontrada em baixios, com profundidade de até 3 metros e *C. spixii* e *A. luniscutis* nos canais com profundidade de até 9 metros (MISHIMA e TANJI, 1983). Picos de IGS (índice gonadossomático utilizado na determinação dos estádios do ciclo reprodutivo) também foram encontrados em épocas diferentes: janeiro para *G. genidens* e setembro para *C. spixii* e *A. luniscutis*, sendo este mecanismo de segregação uma estratégia de otimizar a sobrevivência de suas formas juvenis, evitando competições interespecíficas (GOMES e ARAÚJO, 2004). Diminuição na temperatura da água, pluviosidade e transparência da água também são parâmetros que estariam desempenhando um papel importante na alteração da composição e distribuição da ictiofauna nas baías. Assim, observa-se uma maior ocorrência de espécies como *G. barbus*, *G. genidens* e *A. luniscutis*, que toleram estas variações nas condições ambientais, e uma menor ocorrência de *Cathorops spixii* que desloca para áreas externas da Baía (CORRÊA, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2006). Isto explicaria a dificuldade em se capturar esta espécie no presente estudo, uma vez que as coletas foram realizadas numa mesma época.

Devido a essas características e estratégias particularmente interessantes, muitos estudos sobre a biologia (MISHIMA e TANJI, 1983; AZEVEDO *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 1999; SANTO e ISAAC, 1999, CORRÊA, 2001; GOMES e ARAÚJO, 2004; FAVARO *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2006), sistemática (MARCENIUK e MENEZES, 2007; BETANCUR-R *et al.*, 2007) e taxonomia (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978; TEUGELS, 1996; MARCENIUK, 2005) dos arídeos têm sido realizados com o intuito de colaborar na correta caracterização da família. No entanto poucos estudos são feitos sobre seu padrão de diferenciação cromossômica e evolução cariotípica, o que ajudaria em uma maior compreensão dos processos biológicos de diversificação, das relações entre as espécies e dos processos acarretados na evolução deste grupo de organismo.

Os estudos prévios realizados nas espécies de Ariidae apenas caracterizaram seu número diplóide ($2n$) e número fundamental (NF) porque provavelmente os bandamentos, localização de RONS e técnicas mais modernas como utilização de fluorocromos e hibridação *in situ*, não foram passíveis de realização. Portanto, os dados aqui apresentados são inéditos e têm o intuito de contribuir no entendimento das relações filogenéticas que permeiam a história da família Ariidae, assim como da ordem a qual pertencem, e do grupo como um todo.

5.1 FÓRMULA CARIOTÍPICA

Vários estudos citogenéticos vêm sendo conduzidos em Siluriformes no Brasil, principalmente por representar, junto com Characiformes, a mais rica e diversa ictiofauna de água doce da região neotropical. No entanto, considerando seus exemplares marinhos, a representatividade dos resultados obtidos é ínfima, o que não difere da representatividade encontrada nas espécies marinhas de um modo geral: 120 espécies comparadas às 1.045 de água doce cariotipadas.

No que diz respeito à família Ariidae, a caracterização citogenética de seus representantes está restrita, de um modo geral, às regiões costeiras do México e do Brasil, sendo neste realizado apenas no litoral de São Paulo.

GOMES, PHAN e PASSOS (1990, 1992 e 1994) caracterizaram as espécies *Genidens genidens* ($2n=56$, $NF^*=108$), *Cathorops* sp. ($2n=54$, $NF^*=108$) (identificado posteriormente como *Cathorops spixii*), *Bagre bagre* ($2n=56$, $NF^*=112$), *Netuma barba* (atualmente denominado *Genidens barbatus*) ($2n=56$, $NF^*=110$) e *Arius parkeri* (atualmente *Aspistor luniscutis*) ($2n=56$, $NF^*=110$), todas coletas em Cananéia, litoral Paulista. Seus resultados demonstraram o conservadorismo cariotípico na família Ariidae, como mostrado pela grande maioria dos Siluriformes ($2n=56\pm2$).

No presente estudo, foram analisadas duas populações de *Genidens genidens* (Baía de Antonina e Pontal do Paraná), duas populações de *Aspistor luniscutis* (Ilha do Mel e Baía de Guaratuba) e uma população de *Genidens barbatus* (Baía de Guaratuba).

Para *Genidens genidens* não houve diferença significativa no que diz respeito a macroestrutura cariotípica entre as duas populações. Os resultados corroboraram com os de GOMES, PHAN e PASSOS (1994) para a mesma espécie, apresentando um número diplóide de 56 cromossomos, sendo 7 pares de cromossomos

* NF= Número Fundamental considerando cromossomos metacêntricos, submetacêntricos subtelocêntricos portadores de dois braços e cromossomos acrocêntricos portadores de um braço

metacêntricos, 11 pares de submetacêntricos, 8 pares de subtelocêntricos e 2 pares de acrocêntricos, com um número fundamental (NF) de 108 (Figura 06a). Não foi encontrado heteromorfismo cromossômico sexual.

Para *Aspistor luniscutis*, também não houve diferença entre as populações estudadas, apresentando $2n=56$, sendo 14 cromossomos metacêntricos, 22 submetacêntricos, 20 subtelocêntricos e número fundamental igual a 112 (Figura 06b). Estudos realizados por GOMES, PHAN e PASSOS (1992) na mesma espécie mostraram um $2n=56$, sendo 16 cromossomos metacêntricos, 16 submetacêntricos, 22 subtelocêntricos e 2 acrocêntricos, NF=110. Heteromorfismo cromossômico sexual também não foi observado.

Genidens barbatus apresentou $2n=56$, sendo 14 cromossomos metacêntricos, 16 submetacêntricos, 22 subtelocêntricos - sendo um destes o par sexual - e 4 acrocêntricos, com NF=108 (Figura 06c). GOMES, PHAN e PASSOS (1994) também observaram um $2n=56$, constituído por 18 cromossomos metacêntricos, 18 submetacêntricos, 18 subtelocêntricos e 2 acrocêntricos (NF=110) e a presença de um sistema sexual do tipo XX/XY. Embora no presente estudo terem sido capturados apenas exemplares machos desta espécie, tanto a coloração convencional, o bandamento C e a digestão por enzima de restrição sugerem fortemente a ocorrência deste mesmo sistema sexual na população paranaense.

Os peixes, diferentemente das aves e mamíferos, não apresentam cromossomos sexuais na base de sua filogenia, tendo surgido de forma independente e repetida na história evolutiva desse grupo. Algumas espécies apresentam cromossomos sexuais bem diferenciados, embora essa ocorrência não seja freqüente. Estudos em peixes neotropicais mostraram heterogametia feminina em 64% dos casos e heterogametia masculina nos 36% restantes. Dos casos descritos de sistemas sexuais, 80% correspondem a sistemas simples (77% ZZ/ZW e 23% XX/XY) e 20% a sistemas múltiplos (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1993; GALETTI Jr. *et al.*, 2000; CENTOFANTE *et al.*, 2002).

Existem atualmente duas hipóteses para explicar a origem do sistema sexual: (1) heterocromatinização como a primeira etapa de diferenciação sexual cromossômica, relacionada com a origem e multiplicação de DNA satélite (SINGH *et al.*, 1980) e (2) ocorrência de rearranjos estruturais, diminuindo a taxa de recombinação entre os cromossomos homólogos originais, podendo ser seguido por

um processo de heterocromatinização (BEÇAK *et al.*, 1969 apud ARTONI *et al.*, 1998).

A origem do sistema sexual encontrado em *Genidens barbus* (XX/XY) por GOMES, PHAN e PASSOS (1994) está associada provavelmente à ocorrência de rearranjos estruturais, levando a diferença de tamanho encontrado entre o cromossomo X e Y e posterior heterocromatinização.

Baseado em estudos com cobras, OHNO (1967) sugeriu um importante papel para as inversões pericêntricas na geração de cromossomos sexuais heteromórficos a partir de elementos sexuais homomórficos. Esta hipótese pode ser validada para sistemas onde diferenças de tamanho entre cromossomos sexuais foram descritas (NANDA *et al.*, 1992).

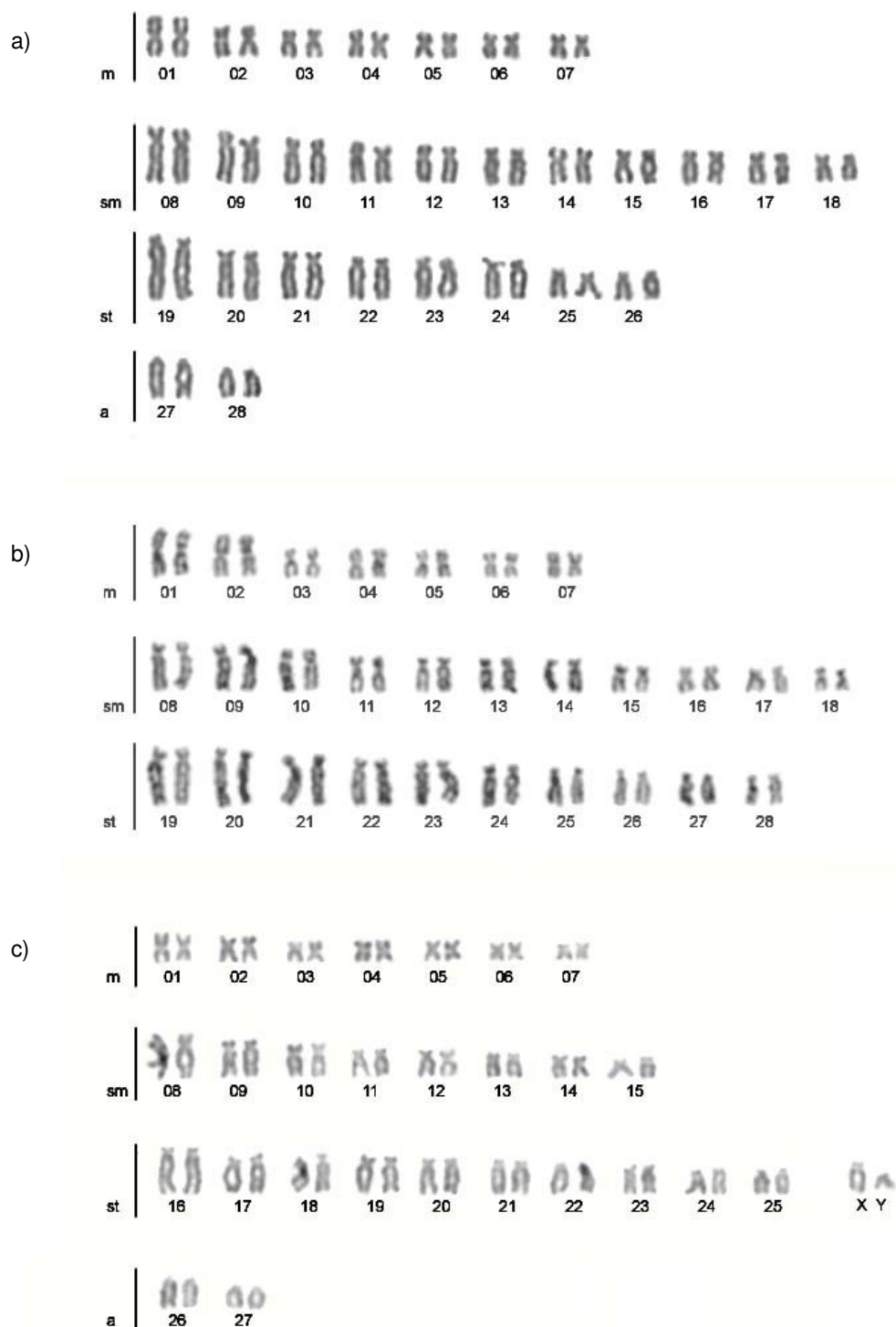


FIGURA 06 - CARIÓTIPO EM GIEMSA DE *G. genidens* (a), *A. luniscutis* (b) E *G. barbatus* (c)

Os dados encontrados aqui reforçam a estabilidade cariotípica proposta para o número diplóide dessa família e da maioria dos Siluriformes ($2n=56\pm 2$) (LEGRANDE, 1980; 1981; FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992a; OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000; RAVEDUTTI e JÚLIO Jr, 2001, entre outros). Além disso o alto valor de número de braços encontrado ($NF=108$ e 112), é também considerado característico da ordem (STOLF *et al.*, 2004) e como é igualmente observado em Characiformes e Gymnotiformes, OLIVEIRA e GOSZTONYI (2000) propõem que esta seria uma condição plesiomórfica amplamente distribuída neste grupo. A macroestrutura cariotípica conservada, principalmente observada nas espécies do gênero *Genidens* do presente estudo, pode ser explicada através da homeostase celular, sendo possível a ocorrência apenas de rearranjos cromossômicos crípticos (VENERE e GALETTI Jr., 1989), como os que envolvem segmentos de heterocromatina e/ou RONS (GALETTI Jr. *et al.*, 2000). A manutenção do número diplóide e mudanças no número fundamental sugerem a ocorrência de rearranjos não robertsonianos. De acordo com KIRPICHNIKOV (1981), mudanças estruturais, como inversões pericêntricas, deleções e duplicações poderiam ser responsáveis por mudanças cariotípicas nas quais o número diplóide é mantido.

Inversão pericêntrica tem sido considerada, para alguns grupos de peixes, particularmente naqueles em que o número diplóide é conservado, o mais importante rearranjo responsável pela variabilidade cariotípica encontrada, por exemplo em Serrasalminae (CESTARI e GALETTI Jr., 1992), Parodontidae (JESUS *et al.*, 1999), Trichomycteridae (BORIN e MARTINS-SANTOS, 1999), Hypoptomatinae (ARTONI e BERTOLLO, 2001), Pomacanthidae (AFFONSO e GALETTI Jr., 2005), Neoplecostominae (KAVALCO *et al.*, 2005) e Pimelodidae (GARCIA e MOREIRA-FILHO, 2005).

Considerando a manutenção do número diplóide para os arídeos, e a diferença no número fundamental observada entre os gêneros *Aspistor* e *Genidens*, pode-se sugerir um importante papel para as inversões pericêntricas na diversificação cariotípica desta família. A fixação destes rearranjos nestas populações pode ter sido facilitada pelo fato de que estes peixes não são bons migradores, com uma conseqüente intensificação dos efeitos de permutas em populações menores.

ROBERTS (1964) apud GARCIA-MOLINA e URIBE-ALCOCER (1988) propõem um alto valor de número diplóide, composto principalmente de

cromossomos do tipo acrocêntrico, sendo que os arídeos mais derivados mostrariam uma tendência à diminuição do $2n$ com aumento do número de cromossomos de dois braços.

Contudo, considerando Galeichthinae a subfamília mais basal dentro dos arídeos (MARCENIUK e MENEZES, 2007), grupo irmão de todos os demais gêneros da família e sendo esta composta apenas pelo gênero *Galeichthys*, poderia-se supor que o número diplóide descrito para *Galeichthys caerulescens* de $2n=52$, $NF=102$ (ARREGUIN, 1983) poderia se tratar do $2n$ ancestral para a família Ariidae.

5.2 BANDAMENTO C

As informações obtidas sobre distribuição e localização de frações heterocromáticas, na qual supõem-se estar concentrada boa parte do DNA satélite, mostram que as seqüências satélites identificadas até o momento em peixes, encontram-se localizadas principalmente na região centromérica dos cromossomos e, como mostrado para outros organismos, devem desempenhar um papel fundamental na estrutura e função de seu centrômero (GALETTI Jr. e MARTINS, 2004). Nos exemplares das três espécies aqui analisadas assim como na grande maioria dos demais peixes estudados, o centrômero mostrou-se heterocromático (banda C+) na maior parte dos cromossomos (figura 03).

A maioria dos Siluriformes apresenta cromossomos pequenos e as bandas obtidas mostram-se geralmente pálidas, dificultando a obtenção e visualização de padrões de bandamento C. De modo geral, os Siluriformes apresentam pouca quantidade de heterocromatina, a qual encontra-se distribuída predominantemente nas regiões centroméricas e teloméricas, assemelhando-se aos dados obtidos para a grande maioria dos teleósteos (GOLD *et al.*, 1990). Há também relatos da ocorrência de marcações intersticiais e polimorfismos para este grupo (GARCIA, 2005).

Além das marcações centroméricas, os exemplares do presente estudo mostraram marcações em regiões teloméricas e blocos heterocromáticos foram encontrados em regiões pericentroméricas e/ou ocupando todo o braço curto de alguns cromossomos metacêntricos (par 06 em *G. genidens*, par 01 em *A. luniscutis*) e submetacêntricos (par 13 em *G. genidens*, par 15 em *A. luniscutis* e pares 09 e 11 em *G. barbatus*) (Figura 07). O cromossomo Y em *G. barbatus* mostrou-se ser em

grande parte heterocromático. Também pôde ser observada coincidência entre marcações banda C+ e pares portadores de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) (Figura 08) quando as metáfases foram submetidas às técnicas seqüenciais de coloração.

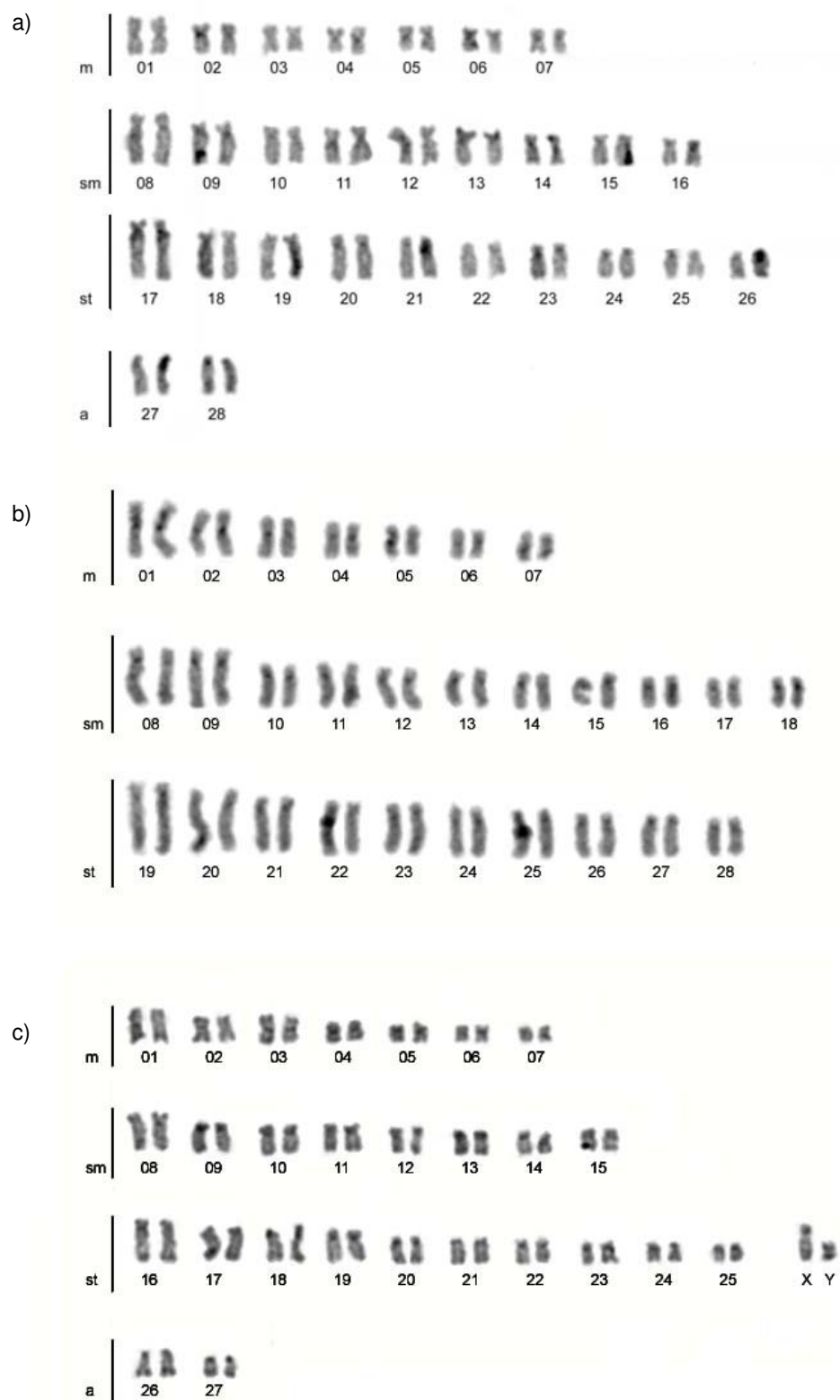


FIGURA 07 – PADRÃO DE BANDAMENTO C ENCONTRADO PARA *Genidens genidens* (a), *Aspistor luniscutos* (b) E *Genidens barbus* (c)

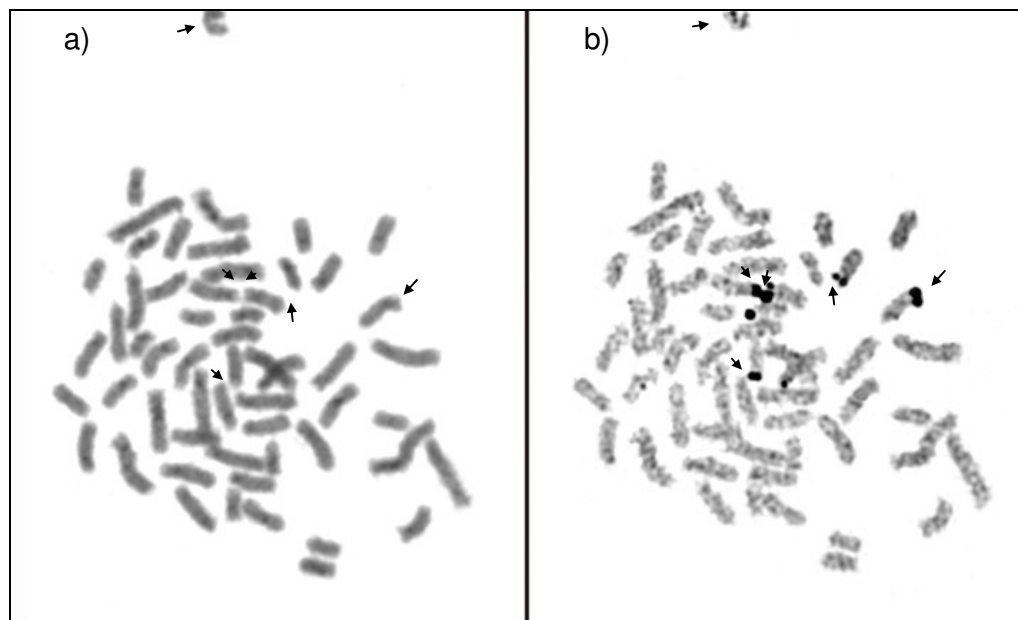


FIGURA 08 - COLORAÇÃO SEQUENCIAL EM *A. luniscutis*: BANDAMENTO C (a) E IMPREGNAÇÃO COM NITRATO DE PRATA (b)

O mesmo padrão de bandamento encontrado no presente estudo, com marcações centroméricas, teloméricas e coincidentes com as regiões nucleolares, também é característico em outras famílias de Siluriformes, como Diplomystidae (OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000), Pimelodidae (SWARÇA *et al.*, 2003; GARCIA e MOREIRA-FILHO, 2005), Auchenipteridae (RAVEDUTTI e JULIO, Jr., 2001) Loricariidae, mais especificamente na subfamília Hypostominae (ARTONI e BERTOLLO, 1996), Heptapteridae, no gênero *Rhamdia* (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1990; FENOCCHIO *et al.*, 2000) entre outros. Considerando esta ampla distribuição, este caráter pode representar uma condição simplesiomórfica para os teleósteos (OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000).

5.3 ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Devido às dificuldades em se obter bons padrões de bandamento C em algumas espécies de peixes, enzimas de restrição têm sido empregadas como método alternativo.

As bandas induzidas por tais enzimas têm sido interpretadas como sendo estritamente dependentes da conformação estrutural da cromatina condensada, da

composição de bases, das diferentes classes de proteínas e de suas interações entre si e/ou com o DNA (FARIA e MORIELLE-VERSUTE, 2002).

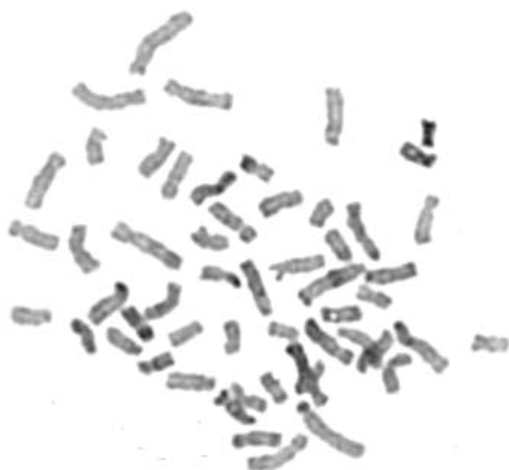
O tratamento com a endonuclease de restrição *Alu* I têm produzido, geralmente, marcações semelhantes às do bandamento C (SWARÇA *et al.*, 2000; FARIA e MORIELLE-VERSUTE, 2002; CIPRIANO, 2005; KANTEK *et al.*, 2007 entre outros).

Para *Genidens genidens* e *Genidens barbatus* as marcações obtidas foram semelhantes às da banda C em quase todos os cromossomos do complemento (Figura 09a e 09c). A ausência ou o padrão de coloração mais fraca em alguns cromossomos, refere-se à extração diferencial do DNA promovida pela *Alu* I.

Enzimas de restrição têm sido utilizadas na análise de seqüências de DNA satélites no estudo de cromossomos sexuais em peixes (NIRCHIO e OLIVEIRA, 2006). Em *Poecilia reticulata*, um par de cromossomos foi identificado como sendo o par sexual do tipo XX/XY, sendo que todos os machos analisados apresentaram no cromossomo Y uma grande região heterocromática telomérica (NANDA *et al.*, 1990). No presente estudo, *G. barbatus* também apresentou um cromossomo pequeno com um grande bloco heterocromático (Figura 09c, seta), sugerindo fortemente a ocorrência deste mesmo sistema sexual (XX/XY) para esta espécie.

Para *Aspistor luniscutis* apenas alguns cromossomos foram marcados em regiões teloméricas e um par de cromossomos submetacêntricos apresentou marcação intersticial (Figura 09b). Blocos heterocromáticos intersticiais podem ser explicados através de inversões pericêntricas, rearranjo comumente observado para alguns grupos de peixes, e sugerido como um importante mecanismo de diversificação cariotípica para esta família. A acessibilidade da enzima (ou ausência) em certas regiões onde se situam blocos heterocromáticos deve-se, provavelmente, a heterogeneidade de natureza apresentada pela heterocromatina da espécie estudada.

a)



b)



c)



Nota: A seta indica o provável cromossomo Y

FIGURA 09 - CROMOSSOMOS METAFÁSICOS DE *G. genidens* (a), *A. luniscutis* (b) E *G. barbus* (c), APÓS TRATAMENTO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO (*Alu* I)

5.4 FLUOROCROMOS BASE-ESPECÍFICOS

Corantes fluorescentes com afinidades por certos segmentos cromossômicos, como Cromomicina A₃ (CMA₃) e DAPI têm sido utilizados para destacar regiões preferencialmente ricas em bases GC e AT, respectivamente, contribuindo com informações importantes sobre a composição da heterocromatina (SOUZA *et al.*, 1996).

Fluorocromos AT específicos normalmente produzem poucas ou nenhuma banda positiva em peixes. Geralmente este tipo de coloração resulta em bandas negativas coincidentes com aquelas CMA₃ positivas ou em uma coloração homogênea nos cromossomos do complemento. No entanto, há casos onde a aplicação dos fluorocromos resultou em sinais positivos adjacentes a porções GC ricas (ARTONI *et al.*, 1999). Regiões ricas em AT também são observadas em peixes, como em alguns Salmonídeos e Zebrafishes, onde segmentos positivos para DAPI, ocorrem juntos com regiões ricas em GC (MAYR *et al.*, 1988)

Para *Genidens genidens* e *Genidens barbus*, a coloração com DAPI mostrou-se uniforme em todos os cromossomos, exceto para as regiões organizadoras de nucléolo (figura 10b e 12b, respectivamente) onde apresentou-se negativa. Esta homogeneidade de sinal ao longo da maioria dos cromossomos após a dupla coloração CMA₃/DAPI sugere ausência de grandes *clusters* ricos em pares de bases GC ou AT nestes peixes, estando igualmente espalhadas na eucromatina e heterocromatina (figura 10a/b e 12a/b), exceto pela porção heterocromática (figura 10c e 12c) associada à RON (figura 10d e 12d).

Esta coincidência entre marcações fluorescentes e RONS foi encontrada também para diversas espécies de peixes (SOLA *et al.*, 1992; DA SILVA CORTINHAS *et al.*, 2003; CIPRIANO, 2005; NOLETO *et al.*, 2006; SCZEPANSKI, *et al.*, 2007 entre outros), incluindo alguns Siluriformes (ARTONI *et al.*, 1999; SWARÇA *et al.*, 1999; SWARÇA *et al.*, 2001a, MAISTRO *et al.*, 2002; GARCIA, 2003; STOLF *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2004a) revelando associações entre segmentos heterocromáticos ricos em bases GC e genes ribossomais (PENDAS *et al.*, 1993). Tais associações, mesmo sendo encontradas comumente em vertebrados inferiores (SCHMID e GUTTENBACH, 1988) incluindo os teleósteos (AMEMIYA e GOLD, 1986), não é considerada regra geral para os mesmos, podendo marcar outras

regiões ricas em GC não concordantes com RONS (ARTONI *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2004).

Para *Aspistor luniscutis*, além das marcações coincidentes com as Regiões Organizadoras de Nucléolo (Figura 11a, b, c e d), alguns cromossomos apresentaram seus telômeros negativos para coloração com DAPI. É possível que uma heterocromatina primariamente rica em GC, mais provavelmente àquela associada à RON, poderia se estender para alguns cromossomos por processos de amplificação. Mecanismos potenciais para isto são: trocas desiguais entre cromossomos, transposições e duplicações regionais (MARGARIDO e GALETTI Jr., 2000).

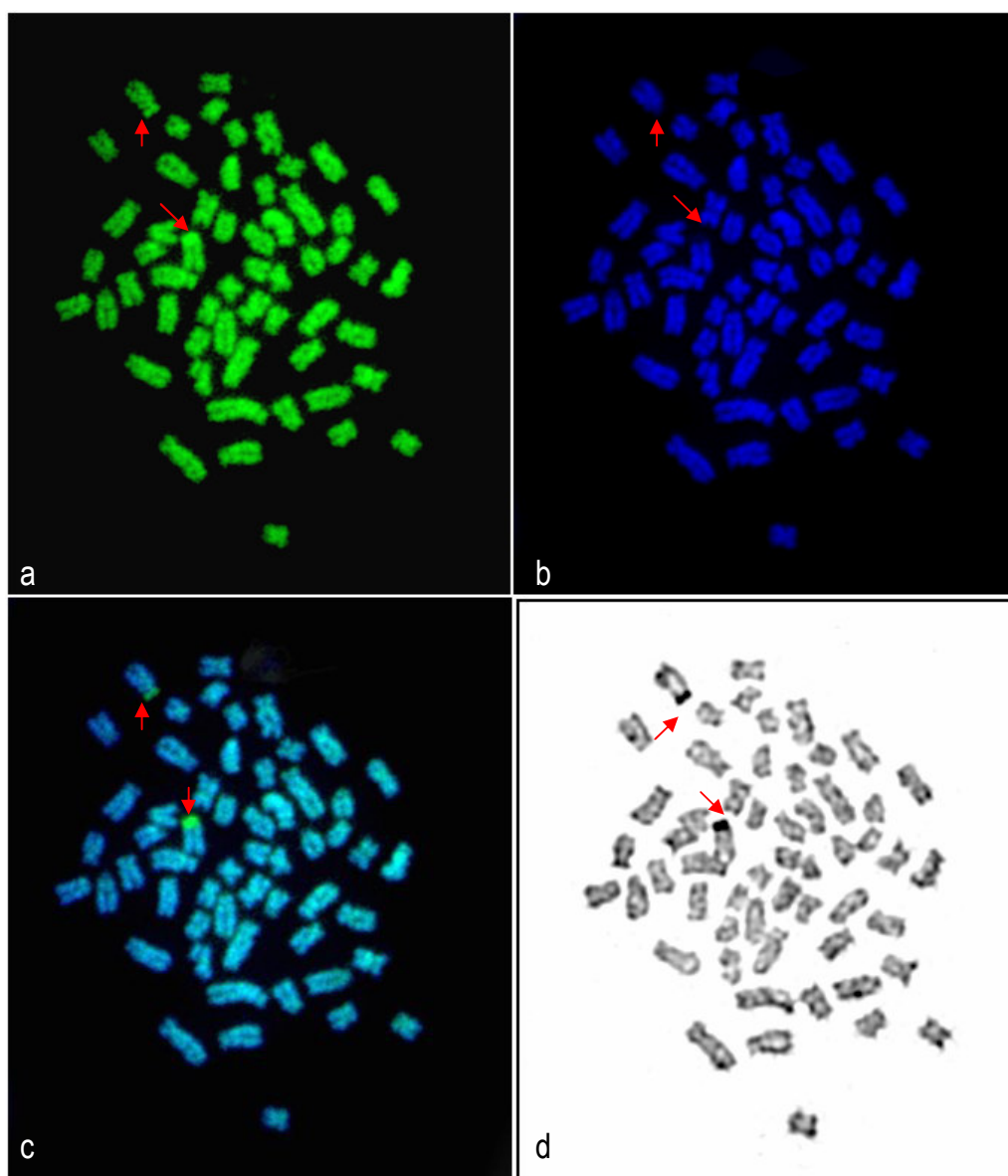


FIGURA 10 – METÁFASE DE *Genidens genidens*, APÓS: DUPLA COLORAÇÃO CMA₃/DAPI (a,b,c) E TRATAMENTO COM AgNO₃ (d)

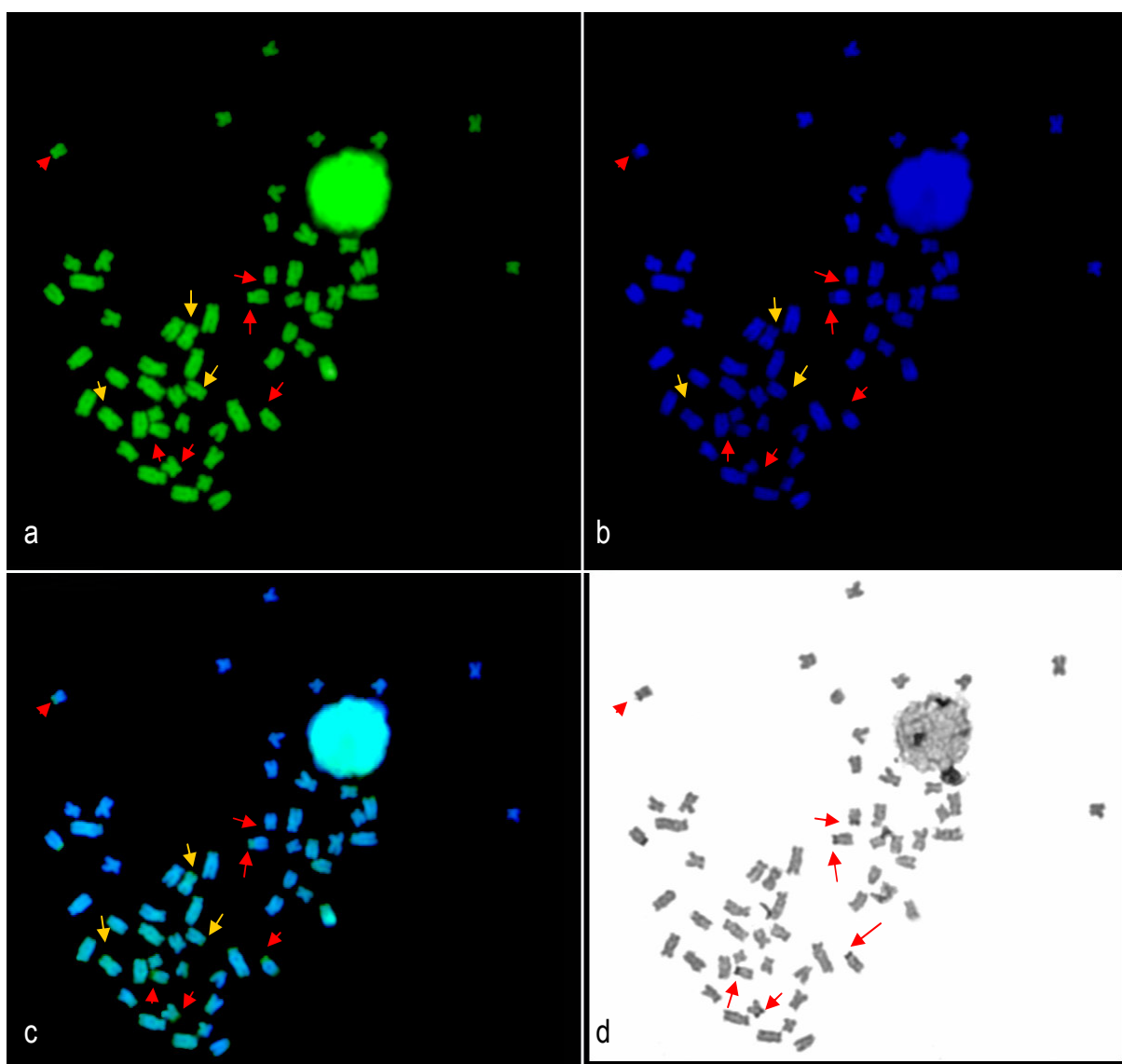


FIGURA 11 – METÁFASE DE *Aspistor luniscutis*, APÓS: DUPLA COLORAÇÃO CMA₃/DAPI (a,b,c) E TRATAMENTO COM AgNO_3 (d)

Nota: As setas em vermelho indicam marcações fluorescentes coincidentes com as RONS e as setas em laranja as marcações adicionais encontradas em alguns telômeros

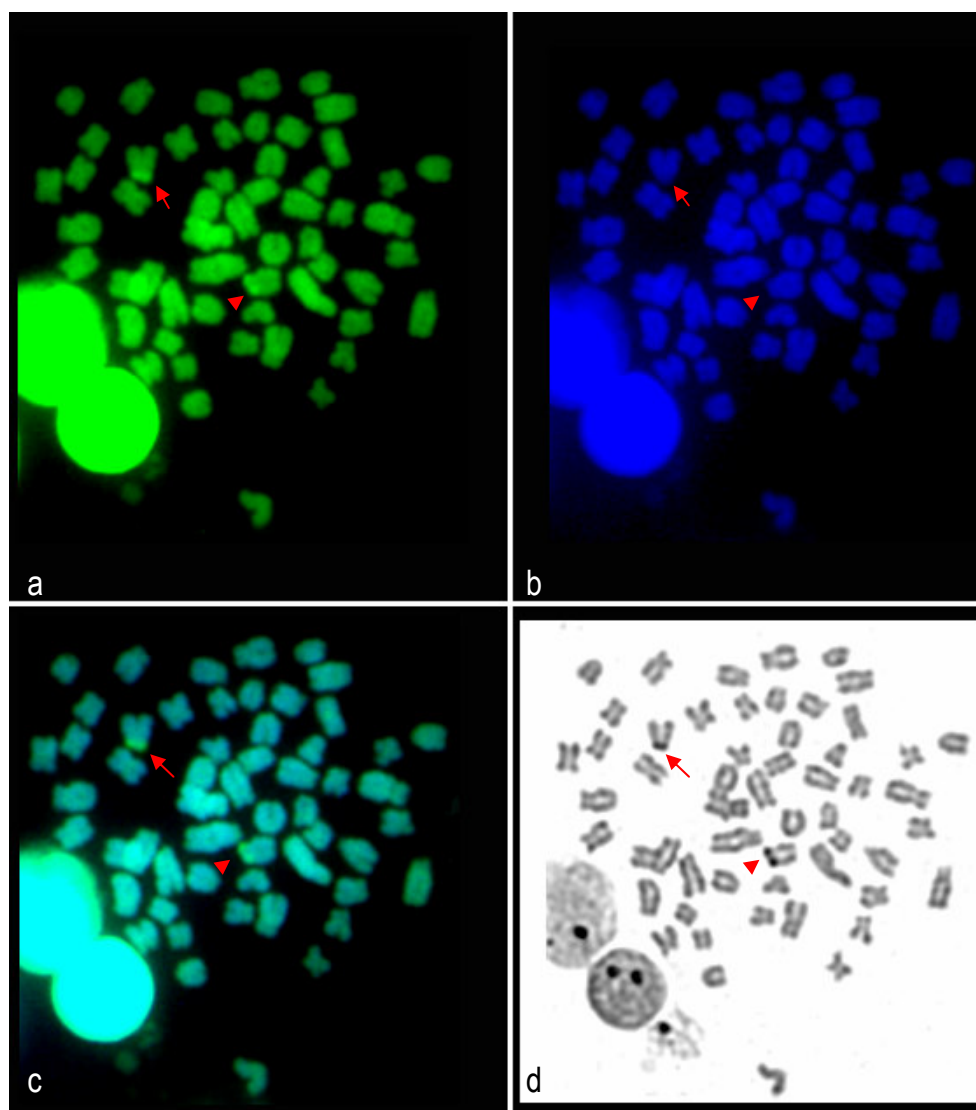


FIGURA 12 – METÁFASE DE *Genidens barbus*, APÓS: DUPLA COLORAÇÃO CMA₃/DAPI (a,b,c) E TRATAMENTO COM AgNO₃ (d)

5.5 CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLEÓLO (RONS) ATRAVÉS DA IMPREGNAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

Através deste método é possível evidenciar apenas RONS ativas, sendo portanto um método de identificação de expressão dos genes ribossomais (HOWELL e BLACK, 1980).

Nos exemplares de *Genidens genidens* analisados, as RONS foram observadas em posição terminal no braço curto de um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 13) como também observado para *Genidens barbatus* (Figura 15).

A presença de somente um par de RONS, sendo estas localizadas terminalmente, como observado para estas espécies, é a condição mais comumente encontrada na maioria dos teleósteos e outras espécies de vertebrados (AMEMIYA e GOLD, 1986). Especialmente entre os Siluriformes, vários casos de RONS simples tem sido detectadas, como em algumas espécies de Pimelodidae (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992a; FENOCCHIO *et al.*, 1993; BORIN e MARTINS-SANTOS, 2002; SWARÇA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003; GARCIA e MOREIRA FILHO, 2005), Ageneiosidae (FENOCCHIO e BERTOLLO, 1992b), Auchenipteridae (RAVEDUTTI e JULIO Jr., 2001) e Doradidae (FENOCCHIO *et al.*, 1993), com possíveis variações ocorrendo no tipo de cromossomo portador e na presença ou ausência de heteromorfismos de tamanho entre cromossomos homólogos. Das 231 espécies descritas quanto ao número e localização das Regiões Organizadoras de Nucleólos, cerca de 71% apresentaram este mesmo padrão (KLINKHARDT, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000) indicando que isto poderia ser considerado um caráter simplesiomórfico para o grupo (OLIVEIRA e GOSZTONYI, 2000).

Heteromorfismo de tamanho das RONS também foi encontrado em *G. genidens* e *G. barbatus* (Figura 13 e 15, respectivamente). Este tipo de heteromorfismo é freqüentemente encontrado em alguns grupos de peixes, especialmente em espécies que apresentam RONS simples (FORESTI *et al.*, 1981). A diferença no tamanho das RONS em cromossomos homólogos pode ser atribuída à: variações no grau de condensação, diferenças na atividade funcional destas regiões ou ainda à mudanças estruturais constituindo um verdadeiro polimorfismo genético (GOLD *et al.*, 1990). Tal heteromorfismo também foi observado após a dupla coloração CMA₃/DAPI (figura 10 e 12) sugerindo a ocorrência de diferenças

estruturais causadas por transposições, permutas desiguais ou por rearranjos de duplicação em *tandem* de uma das RONS.

Aspistor luniscutis apresentou RONS múltiplas situadas em 3 pares cromossômicos, podendo evidenciar também um heteromorfismo de tamanho em um par de cromossomos submetacêntricos (Figura 14). A ocorrência de RONS múltiplas e/ou posição intersticial das mesmas, pode ser considerada uma apomorfia para as espécies que as possuem (HSU *et al.*, 1975). Esta variabilidade também tem sido observada em algumas famílias de Siluriformes como em Callichthyidae (OLIVEIRA *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1992; PORTO e FELDBERG, 1992) e Loricariidae (ARTONI e BERTOLLO, 1996)

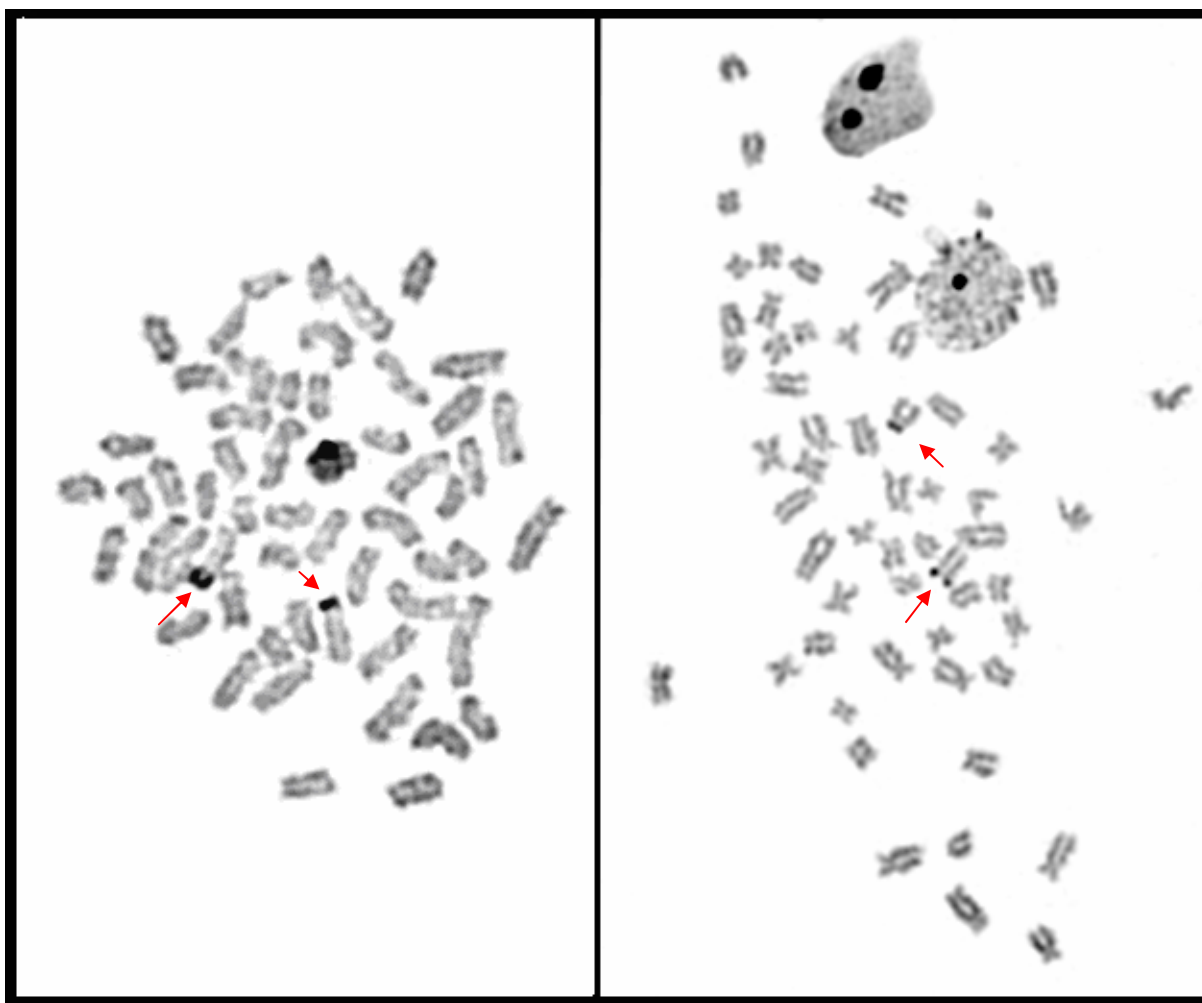


FIGURA 13 – METÁFASES DE *G. genidens* APÓS TRATAMENTO COM AgNO_3

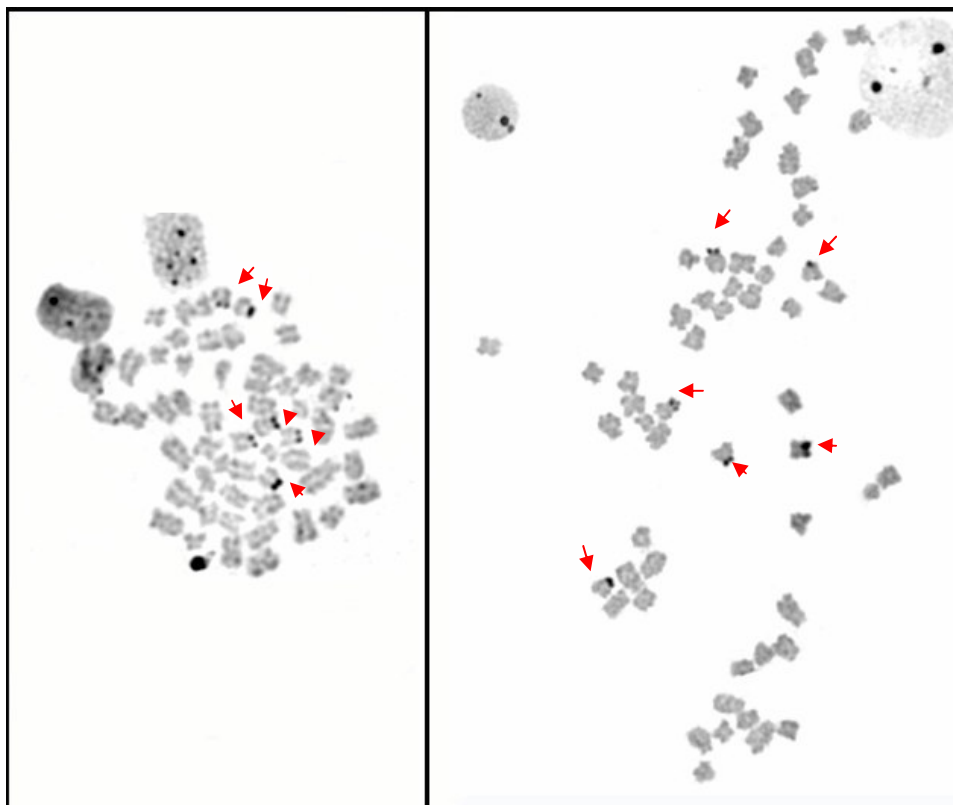


FIGURA 14 – METÁFASES DE *A. luniscutis* APÓS TRATAMENTO COM AgNO_3

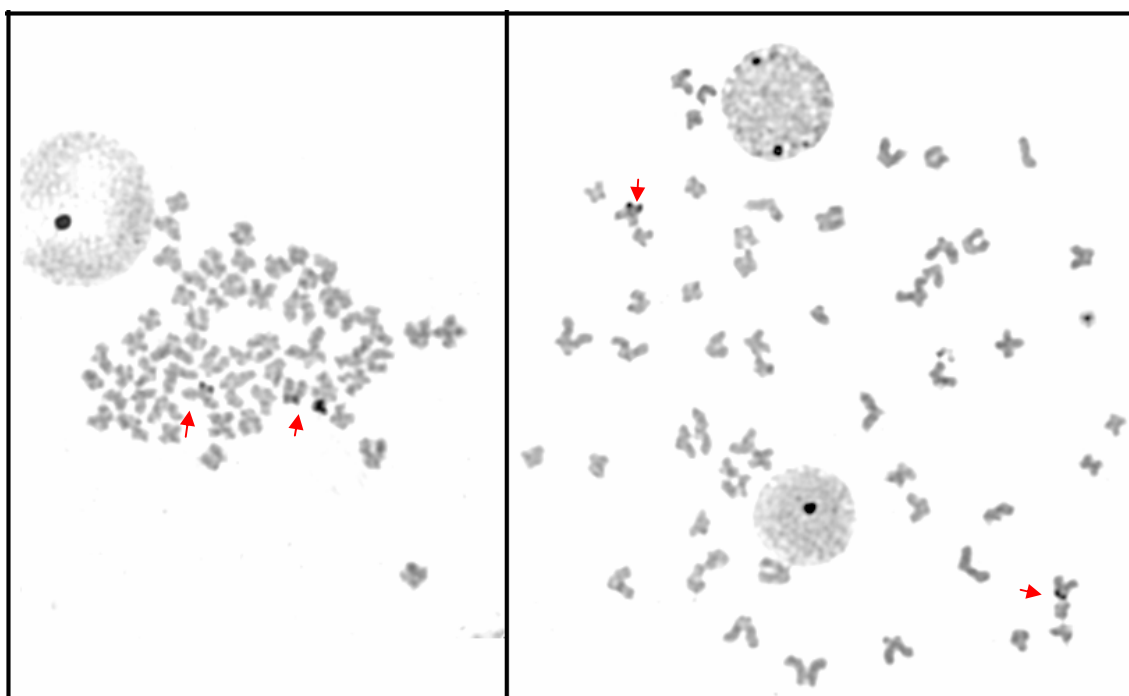


FIGURA 15 – METÁFASES DE *G. barbus* APÓS TRATAMENTO COM AgNO_3

5.6 HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* (FISH) COM SONDAS rDNA 18S

Tanto em *Genidens genidens* (Figura 16) quanto em *Genidens barbus* (Figura 17), a hibridação fluorescente com sondas rDNA 18S confirmaram a localização terminal das RONS em um par de cromossomos submetacêntricos. Para *Aspistor luniscutis* as marcações com as sondas rDNA 18S também foram coincidentes com localizações múltiplas mostradas pela coloração com AgNO_3 (Figura 18).

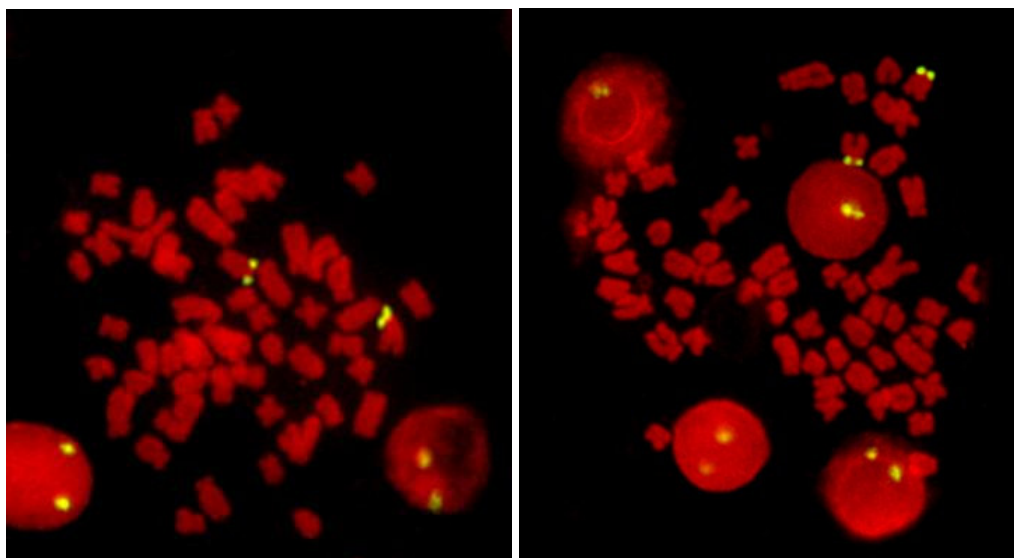


FIGURA 16 – HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* EM *G. genidens* COM SONDA rDNA 18S

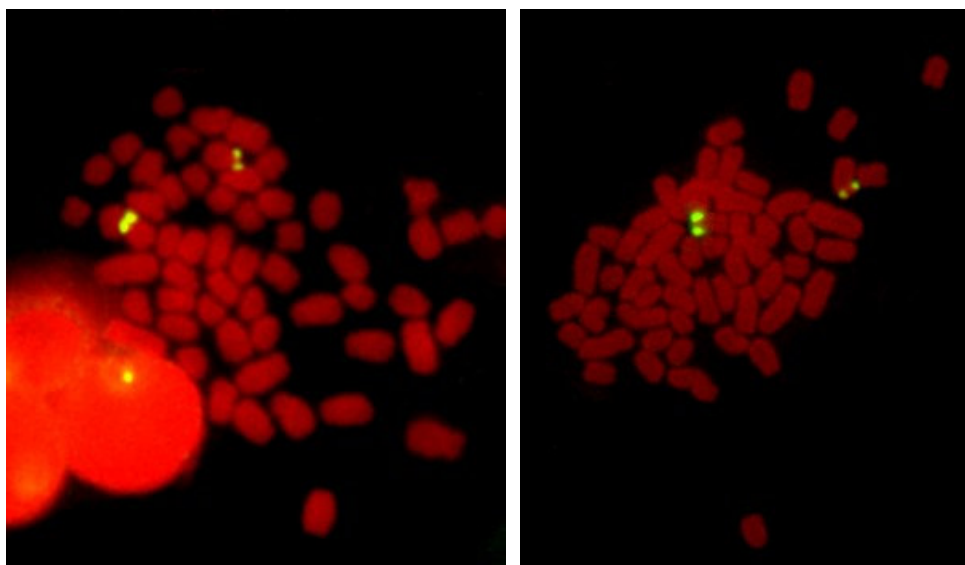


FIGURA 17 – HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* EM *G. barbus* COM SONDA rDNA 18S

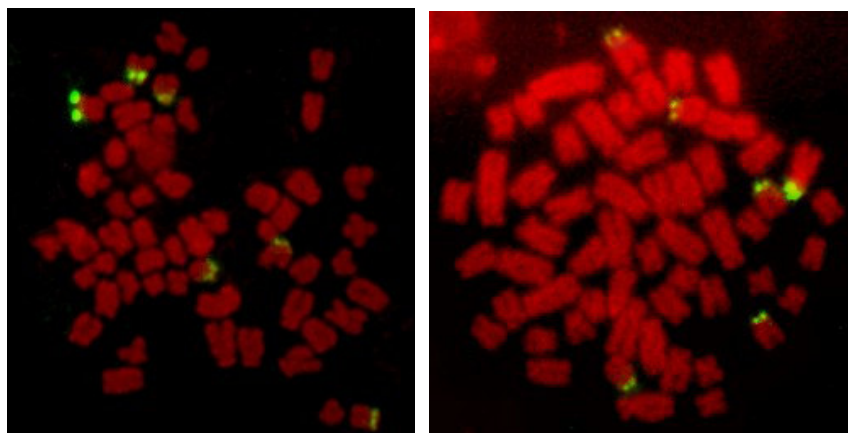


FIGURA 18 – HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* EM *A. luniscutis* COM SONDA rDNA 18S

Tais marcações foram coincidentes com os resultados obtidos por impregnação com nitrato de prata (Figura 13, 14 e 15), assim como pela aplicação do fluorocromo base-específico CMA₃ (Figura 10, 11 e 12), sugerindo que o heteromorfismo observado possa ser devido à diferença no número de cópias de *cístrons* ribossomais (Figura 20a,b,c). A dispersão desses segmentos no genoma através de eventos de transposições poderia ser facilitada pelo fato destas regiões serem heterocromáticas (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1984), frequentemente encontradas associadas (Figura 19) e por estarem localizadas em regiões teloméricas que são ambientes propícios para esta transferência quando estão próximas no núcleo interfásico (SCHWEIZER e LOIDL, 1987).

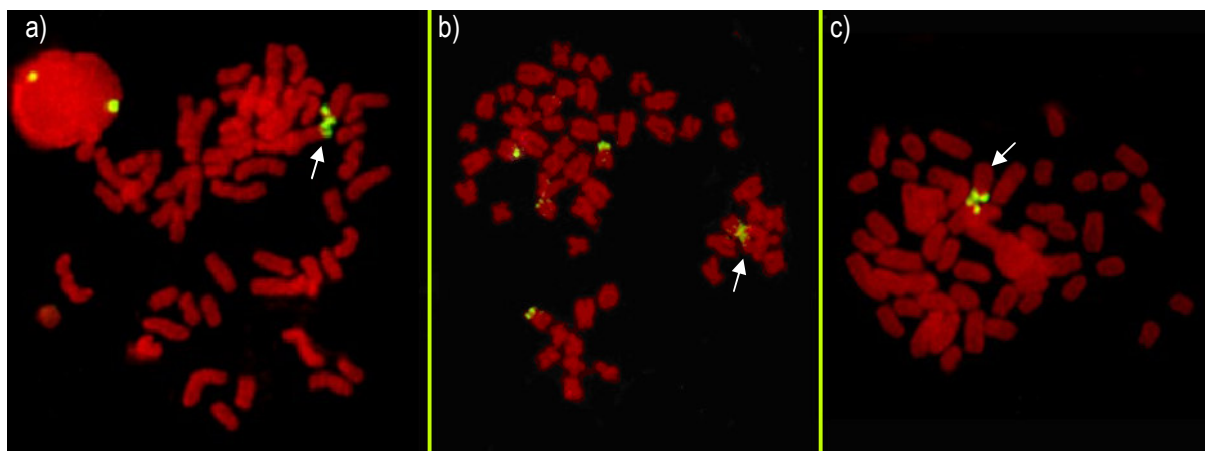
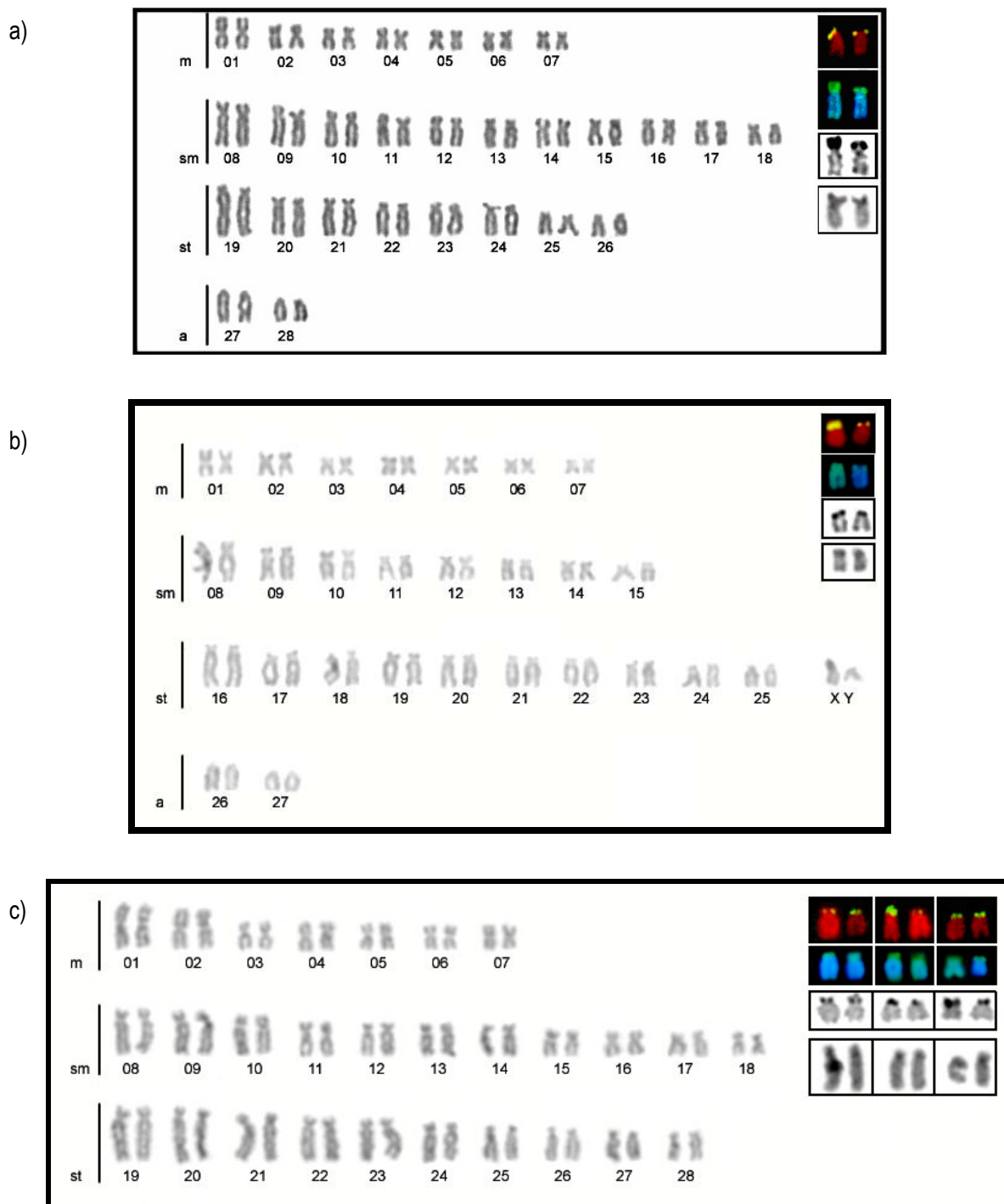


FIGURA 19 - ASSOCIAÇÕES ENTRE CROMOSSOMOS PORTADORES DAS RONs OBSERVADAS EM *G. genidens* (a), *Aspistor luniscutis* (b) E *G. barbatus* (c)



Heteromorfismos observados por Ag-RONs, CMA₃+ e confirmados por hibridação *in situ* também puderam ser evidenciados em alguns Siluriformes, como: *Conorhynchos conirostris*, *Lophiosilurus alexandri* (GARCIA e MOREIRA-FILHO, 2002), *Pimelodus maculatus*, *P. argenteus* e *P. absconditus* (SOUZA *et al.*, 2004b), *Steindachneridion* sp. (SWARÇA *et al.*, 2001b), *Zungaro zungaro* (SWARÇA *et al.*, 2001c) entre outros.

5.7 HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* (FISH) COM SONDAS rDNA 5S

Dados referentes à localização dos genes da subunidade ribossômica menor em Siluriformes mostram-se ainda bastante incipientes. Analisando 19 gêneros dentro da ordem, ALMEIDA-TOLEDO *et al.* (2007) propõem uma tendência não conservativa de número e localização do gene ribossomal 5S dentro das famílias, embora uma conservação ocorra dentro da maioria dos gêneros analisados, sendo *Pimelodus* e *Hypostomus* uma exceção.

Resultados com hibridação *in situ* com sonda rDNA 5S foram obtidos apenas para *Genidens genidens*, sendo que nesta espécie foi visualizada a marcação intersticial em um par de cromossomos acrocêntricos (Figura 21). O par portador da RON pode ser facilmente distinguido devido a sua marcação positiva para iodeto de propídeo (IP) (Figura 21, setas brancas). Os conteúdos GC presentes neste par aumentam a temperatura de fusão do DNA e consequentemente a RON permanece em dupla fita durante a desnaturação, incrementando, portanto, a afinidade para iodeto de propídeo (RAB *et al.* 1996).

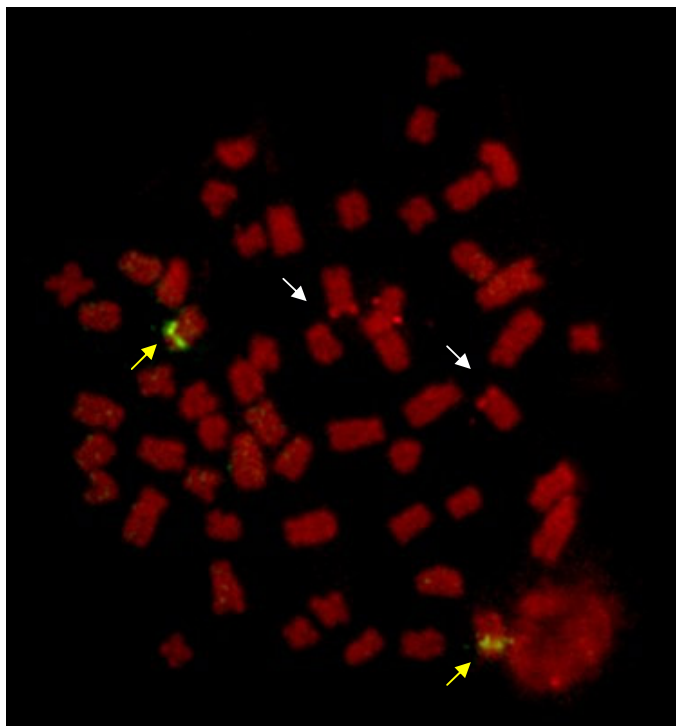


FIGURA 21 – HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *in situ* EM *G. genidens* COM SONDA rDNA 5S

Nota: As setas em branco indicam o par portador da RON e as setas amarelas os sítios rDNA 5S

A localização em arranjos independentes e ambientes cromossômicos distintos dos sítios rDNA 45S e rDNA 5S, mostram como sendo a situação mais comumente observada nos peixes (MARTINEZ *et al.*, 1996; GALETTI Jr. e MARTINS, 2004) e nos vertebrados de modo geral (SUZUKI *et al.*, 1996). Esta divergência de localização, parece representar uma condição ótima que evita interferências na harmonia desses sítios de múltiplas cópias (MARTINS e GALETTI Jr., 1999).

Na maioria dos organismos, incluindo peixes, os genes rDNA 5S são localizados em um par cromossômico (PENDAS *et al.*, 1994), sendo provavelmente esta a condição mais primitiva entre os grupos animais (MARTINS e GALETTI Jr., 1999). A ocorrência em mais de um par sugere que tais *clusters* podem estar evoluindo separadamente.

O mapeamento destes genes em vários peixes, tem mostrado localizações em segmentos intersticiais dos cromossomos, como também observado em anfíbios e mamíferos (MARTINS e GALETTI Jr., 2001; GALETTI Jr. E MARTINS, 2004). A área intersticial do cromossomo pode proteger de eventos evolutivos, tais como

transposições, que poderiam agir na dispersão destas sequências. No entanto, relatos de localização terminal de tais sítios também têm sido observados nos peixes como em alguns Tetraodontiformes (MANDRIOLI e MANICARDI, 2001; NOLETO *et al.*, 2006), Perciformes (MANDRIOLI *et al.*, 2001), Atheriniformes (SCZEPANSKI *et al.*, 2007), entre outros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresentou uma análise citogenética para três espécies pertencentes à família Ariidae, coletadas no litoral paranaense: *Genidens genidens*, *Aspistor luniscutis* e *Genidens barbatus*. As duas primeiras tiveram uma análise citogenética populacional comparativa, enquanto na última, abordou-se peculiaridades cromossômicas detectadas apenas em uma população. Com os resultados destas análises, algumas tendências de evolução cariotípica puderam ser levantadas.

Foi notória a manutenção do número diplóide ($2n=56$) para as três espécies analisadas, reforçando a estabilidade cariotípica proposta para a família Ariidae, assim como para a maioria dos Siluriformes. Também pôde ser observado um alto valor de número fundamental (NF), indicando a presença de grande parte de cromossomos de dois braços na composição de seus cariótipos, sendo este um caráter plesiomórfico amplamente distribuído no grupo.

Marcadores citogenéticos se mostraram resolutivos na identificação de uma estreita relação filogenética entre as espécies do gênero *Genidens*, como a presença de um par portador das RONS (este apresentando heteromorfismo de tamanho), mesma fórmula cariotípica (NF=108) e mesmo padrão de bandamento C, com marcações centroméricas e blocos heterocromáticos ocupando o braço curto de alguns cromossomos. A diferença entre estas duas espécies se deve principalmente à presença de um sistema cromossômico sexual do tipo XY observado em *G. barbatus*. A ocorrência de espécies estreitamente relacionadas com e sem presença de cromossomos sexuais vivendo em sintopia, indica que este sistema sexual representa uma importante barreira reprodutiva entre estas espécies.

As inversões pericêntricas, como variações estruturais, parecem atuar fortemente na diversificação cariotípica desta família, como demonstrado pela divergência no número fundamental encontrado entre os gêneros *Genidens* e *Aspistor*, devido à ausência de cromossomos acrocêntricos no cariótipo deste último. Neste contexto tais rearranjos mostram ter significados adaptativos, dada a frequência que ocorrem nesta condição ambiental.

A aplicação de técnicas de citogenética molecular, mais especificamente a FISH com sondas rDNA 18S, mostrou-se bastante informativa na caracterização cromossômica destas espécies. Desta forma, as variações observadas com relação

aos genes ribossomais - RONS múltiplas em *Aspistor* e RONS simples em *Genidens* - podem constituir um importante marcador citotaxonômico. Variações no número, posição e tamanho de RONS têm sido encontradas em diferentes grupos de peixes e, de acordo com KLINKHARDT (1998), isto pode fornecer informação valiosa sobre diferenças intra e inter específicas, que ajudaria na definição da posição taxonômica de tais espécies em termos de evolução cariotípica.

Em resumo, as populações apresentaram particularidades citogenéticas, permitindo diferenciar as espécies aqui estudadas, podendo-se considerar como caracteres diagnósticos: fórmula cariotípica, presença de sistema cromossômico sexual, número e posição da RONS, quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva. Tais polimorfismos cromossômicos refletem o significado deles na variabilidade cariotípica do grupo.

Tais resultados contribuem para um melhor entendimento dos processos de diferenciação e evolução cromossômica, e em associações com outras abordagens, sejam elas morfológicas e/ou moleculares, permitem compreender melhor a biodiversidade de nossa ictiofauna.

7 CONCLUSÕES

- a) *Genidens genidens*, *Genidens barbatus* e *Aspistor luniscutis* apresentaram o mesmo número diplóide ($2n=56$), reforçando a estabilidade cariotípica proposta para esta família, assim como para a maioria dos Siluriformes ($2n=56\pm 2$);
- b) O alto valor de NF encontrado para as três espécies (NF=108 para *G. genidens* e *G. barbatus* e NF=112 para *A. luniscutis*) pode ser considerado um caráter plesiomórfico amplamente distribuído entre os Siluriformes;
- c) As inversões pericêntricas parecem ter um papel fundamental na diversificação cariotípica nesta família;
- d) Embora não tenham sido capturados exemplares fêmeas de *G. barbatus*, a coloração convencional, o bandamento C e a digestão por enzima de restrição sugerem a ocorrência do sistema sexual (XX/XY) na população paranaense, como já descrito por GOMES, PHAN e PASSOS (1994) para esta espécie no litoral paulista;
- e) Um padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva pode ser observado para as três espécies, tanto através do bandamento C quanto pela digestão pela enzima *Alu* I, com marcações centroméricas, teloméricas e coincidentes com as RONS. As RONS mostraram-se ser regiões ricas em pares de bases GC quando tratadas com CMA_3 ;
- f) *G. genidens* e *G. barbatus* apresentaram apenas um par de cromossomos submetacêntricos portadores de RONS sendo estes heteromórficos quanto ao tamanho, evidenciados através de hibridação fluorescente *in situ* com sondas rDNA 18S e impregnação com nitrato de prata;
- g) *Aspistor luniscutis* apresentou RONS múltiplas, também com heteromorfismos de tamanho, evidenciados por FISH com sondas rDNA 18S e AgNO_3 , sendo este caráter considerado apomórfico;
- h) Marcação intersticial em um par de cromossomos acrocêntricos foi obtido através da hibridação *In situ* fluorescente com sondas rDNA 5S na espécie *G. genidens*, situação mais comumente observada nos peixes e em vertebrados em geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, P. R. A. M. **Caracterização citogenética de peixes de recifes de corais da família Pomacanthidae (Perciformes)**. 115p. Dissertação (Mestrado: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2000.

AFFONSO, P. R. A. M. e GALETTI Jr., P. M. Chromosomal diversification of reef fishes from genus *Centropyge* (Perciformes, Pomacanthidae). **Genet.**, v.123 (3), p. 227-233, 2005.

ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; GARCIA, C.; BRANDÃO, K.O.; PEIXOTO, M. S.; RODRIGUES, R. M. e CLARO, F. L. Tendências de localização e de número de sítios do gene ribossomal 5S em 19 gêneros de Siluriformes. In: 53^º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. **Res...** Águas de Lindóia, SP, 2007.

AMEMIYA, T. e GOLD, J. R. Chromomycin A₃ stains nucleolus organizer regions of Fish chromosomes. **Copeia** v.1, p. 226-231, 1986.

ÂNGULO, R. J. e ARAÚJO, A. D. Classificação da costa paranaense com base na sua dinâmica, como subsídio à ocupação da orla litorânea. **Bol. Par. Geoc.**, Curitiba, v. 44, p. 7-17, 1996.

ARRATIA, G. Description of the primitive family Diplomystidae (Siluriformes, Teleostei, Pisces): morphology, taxonomy and phylogenetic implications. **Bonn. Zool. Monogr.** v. 24, p.1-120, 1987.

ARRATIA, G. Phylogenetic relationships of Teleostei: Past and Present. **Estud. Oceanol.** v.19, p.19-51, 2000.

ARRATIA, G., KAPOOR, B. G., CHARDON, M. e DIOGO, R.. **Catfishes**. Science Publishers, EnWeld, NH, 2003.

ARREGUIN, R. E. Caracterización citogenética en el bagre marino (*Galeichthys caeruleus*). In: VII CONG. NL. ZOOL. **Res...** 1983.

ARTONI, R. F. e BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic Studies In Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. **Caryol.** v. 49, p.81-90, 1996.

_____; VENERE, P. C. e BERTOLLO, L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytol.** v.63, p.421-425, 1998.

_____; MOLINA, W. F.; BERTOLLO, L. A. C. e GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genet. Mol. Biol.** v.22 (1), p. 39-44, 1999.

_____; VICARI, M. R. e BERTOLLO, L. A. C. Citogenética de peixes Neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. PUBLICATIO-UEPG: **Biol. Health Scien.**, v. 6(1), p. 43-60, 2000.

_____ e BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hered.** v.134, p. 201-210, 2001.

AZEVEDO, M. C. C.; ARAÚJO, F. G.; CRUZ-FILHO, A. G.; GOMES, I. D. e PESSANHA, A. L. M. Variação espacial e temporal de Bagres Marinhos (Siluriformes, Ariidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Biol.** v. 59(3), p. 443-454, 1999.

BERRA, T. M. **Freshwater fish distribution**. London: Academic Press, 2001.

BETANCUR-R, R. **Filogenia de los bagres marinos (Siluriformes: Ariidae) del nuevo mundo**. 117p. Tesis de Maestria - Universidad Nacional de Colômbia, 2003.

BETANCUR-R, R.; ARTURO, A. P.; BERMINGHAM, E. e COOKE, R. Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. **Mol. Phylog. Evol.** doi:10.1016/j.ympev.2007.02.022.

BIZERRIL, C. R. S. F. e COSTA, P. A. S. **Peixes marinhos do estado do Rio de Janeiro**. Fundação de Estudos do Mar, 2001.

BOCHLERT, G. W. e MUNDY, B. C. Roles of behavioral and physical factor in larval and juvenile fish recruitment to estuarine nursery areas. **Am. Fish. Soc. Symp.** v.3, p. 51-67, 1988.

BORIN, L. A. e MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from Iguaçu river basin. **Genet.**, v. 106, p. 3-8, 1999.

_____ e MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic aspects in species of the genus *Pimelodus* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) of the river Paraná Basin. **Cytol.** v.67, p. 199-204, 2002.

BRIGGS, J. C. The biogeography of otophysian fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. **J. of Biog.** v. 32, p. 287-294, 2005.

BRITSKY, H. A.; SATO, Y. e ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. 3ª ed. Brasília: CODEVASF. 115 p, 1988.

BRUM, M. J. I. Correlações entre a filogenia e a citogenética dos peixes teleósteos. Soc. Bras. de Gen. **Série Monografias**. v.2, p. 5-42, 1995.

_____. Cytogenetic studies of Brazilian marine fish. **Braz. J. Genet.** v.19(3), p. 421-427, 1996.

_____ e GALETTI Jr., P. M. Teleostei Ground Plan Karyotype. **J. Comp. Biol.** v.2(2), p. 91-102, 1997.

_____; AFFONSO, P. R. A. M.; MOTA, L. C. G.; PAULS, E. e NETTO, M. R. C. B. Cytogenetic characterization of *Porichthys porosissimus* (Velenciennes, 1857) (Batrachoidiformes) from the Rio de Janeiro Coast, Brazil. **Chrom. Science**. v. 5, p.15-18, 2001.

CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L. A. C e MOREIRA-FILHO, O. A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). **Caryol.** v. 55, p. 139-150, 2002.

CESTARI, M. M. e GALETTI Jr., P. M. Chromosome Studies of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Parana-Paraguay Rivers: Evolutionary and Cytotaxonomic Considerations. **Copeia**. v. 1, p. 108-112, 1992.

CHAVES, P. de T. da C. e CORRÊA, M. F. M. Composição ictiofaunística da área de manguezal da Baía de Guaratuba, Estado do Paraná, Brasil (25º 52'S; 48º 39' W) **Rev. Bras. Zool.** v. 15(1), p. 195-202, 1998.

CHAVES, P. e BOUCHEREAU, J- L. Biodiversité et dynamique des peuplements ichtyiques de la mangrove de Guaratuba, Brésil. **Oceanol. Acta**. v. 22(3), p. 353-364, 1998.

CHOUDHURY, R. C.; PRASAD, R. e DAS, C. C. Chromosomes of four Indian marine catfishes (Bagridae, Ariidae: Siluriformes) with a heteromorphic pair in male *Mystus gulio*. **Caryol.** v. 46(2-3), p. 233-243, 1993.

CIPRIANO, R. R. **Estudos Citogenéticos em Teleósteos marinhos pertencentes a Baía de Paranaguá- Paraná, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CORRÊA, M. F. M. **Ictiofauna da Baía de Guaraqueçaba (Paraná, Brasil). Composição, estrutura, distribuição espacial, variabilidade temporal e importância como consumo.** Tese (Doutorado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

DA SILVA CORTINHAS, M. C.; CESTARI, M. M.; SWARÇA, A. C. e FENOCCHIO, A. S. First chromosome data about the silverside *Atherinella brasiliensis* (Atheriniformes, Pisces) from the south coast of Brazil. Conventional, Ag-NOR and CMA₃ bandings and FISH studies. **Caryol.** v. 56(2), p. 187-191, 2003.

DE PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and synthesis of hypotheses. *In*: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes.** Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 278-330, 1998.

DIOGO, R. Muscles versus bones: catfishes as a case study for a discussion on the relative contribution of myological and osteological features in phylogenetic reconstructions. **Anim. Biol.** v. 54, p. 373-391, 2004.

FARIA, K. C. e MORIELLE-VERSUTE, E. *In situ* hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with *AluI*. **Genet. Molec. Biol.** v. 25(4), p. 365-371, 2002.

FAVARO, L. F.; FREHSE, F. de A.; OLIVEIRA, R. N. e SCHWARZ Jr., R. Reproduction of the Madamango sea catfish, *Cathorops spixii* (Agassiz) (Siluriformes, Ariidae), of the Pinheiros Bay, estuarine coastal area of Paraná, Brazil. **Rev. Bras. Zool.** v. 22(4), 2005.

FENOCCHIO, A.S e BERTOLLO, L. A. C. . Supernumerary Chromosomes in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). **Genet.** v. 81, p. 193-198, 1990.

_____; VENERE, P. C.; CESAR, A. C. G.; DIAS, A. L. e BERTOLLO, L. A. C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryol.** v. 44(2), p. 161-166, 1991.

_____ e BERTOLLO, L. A. C. (a). Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. **Cytobios.** v. 69, p. 41-46, 1992.

_____ e BERTOLLO, L. A. C. (b). Karyotype, C-bands and NORs of the Neotropical Siluriform Fish *Ageneiosus brevifilis* and *A. atronases* (Ageneiosidae). **Cytobios**, v. 72, p. 19-22, 1992.

_____; VENERE, P. ; JORGE, L. C. e BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetic characterization of some Doradidae species (Pisces, Siluriformes). **Rev. Bras. Genet.** v. 16(4), p. 1097-1101, 1993.

_____; BERTOLLO, L. A. C. ; TAKAHASHI, C. S. e CAMACHO, J. P. Considerations on B-Chromosome origin and distribution in fish populations of the *Rhamdia* genus (Siluriformes, Pimelodidae). **Folia Biol.** v. 48(3-4), p. 105-109, 2000.

_____; PASTORI, M. C.; RONCATI, H.; MOREIRA FILHO, O. e BERTOLLO, L. A. C. A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina. **Caryol.** v. 56(2), p. 197-204, 2003.

FERNANDEZ, J. L.; GOYANES, V. J.; RAMIRO-DIAS J. e GOSALVEZ, J. Evidence of a differential organization of chromatin containing terminal or interstitial (TTAGGG)(n) repeats by *in situ* digestion with nucleases. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 82, p. 195-198, 1998.

FERRARIS Jr., C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa.** v.1418, p. 1–628, 2007.

FIGUEIREDO, J. L. e MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil. II Teleostei** (1). Universidade de São Paulo, Museu de Zoologia, 110p., 1978.

FINK, S. V. e FINK, W. L. Interrelationships of the ostariophysian fishes. **Zool. J. Linn. Soc.** v. 72, p. 297-353, 1981.

FITZSIMONS, J.; LEGRANDE, M. e KORTH, J. Karyology of the marine catfish *Bagre marinus* Ariidae with an analysis of chromosome numbers among siluriform fishes. **J. Ichthyol.** v. 35, p.189-193, 1988.

FONTANA F., ROSSI, R.; LANFREDI, M.; ARLATI, G. e BRONZI, P. Cytogenetic characterization of cell lines from three sturgeon species. **Caryol.** v. 50, p. 91-95, 1997.

FORESTI, F. ; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. e TOLEDO FILHO, S. A. Polymorphic Nature of Nucleolus Organizer Regions in Fishes. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 31, p. 137-144, 1981.

GALLETI Jr., P. M.; AGUILAR, C. T. e MOLINA, W. F. An overview of marine fish cytogenetics. **Hydrobiol.** v. 420, p. 55-62, 2000.

_____ e MARTINS, C. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. Capítulo 3. In: GUERRA, M. S. (Org.). **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, p.61-88, 2004.

GARCIA, A. M. ; BURNS, M. D. M. e VIEIRA, J. P. *Genidens genidens* (Cuvier) (Pisces, Ariidae), oral incubation of eggs. **Pan-Amer. J. Aquat. Scien.** (Original scientific photographs), 2006.

GARCIA, C. e MOREIRA FILHO, O. Estudos citogenéticos em *Conorhynchus conirostris* e *Lophiosilurus alexandri* (Pisces, Siluriformes) da bacia do Rio São Francisco. In: X CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSCar. **Anais...** São Carlos, 2002.

_____. **Contribuição aos estudos citogenéticos de representantes de três famílias de Siluriformes**. Monografia - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 2003.

_____. **Contribuições aos estudos citogenéticos em algumas espécies de 5 famílias de Siluriformes do rio São Francisco**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 2005.

_____ e MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. **Neotrop. Ichthyol.** v. 3(2), p. 285-290, 2005.

GARCIA, F.; NOGUES, C.; GARCIA, M.; EGOZCUE, J. e PONSÀ, M. Characterization of constitutive heterochromatin in *Cebus apella* (Cebidae, Primates)

and *Pan troglodytes* (Hominidae, Primates): comparison to human chromosomes. **Am. J. Primatol.** v. 49, p. 205-221, 1999.

GARCIA-MOLINA, F. e URIBE-ALCOCER, M. Análisis Cromosómico del Bagre Marino *Arius felis* (Ariidae: Siluriformes) de la Región de la Laguna de Términos, Campeche. **An. Inst. Cienc. Mar Limnol.** v. 16, p. 69-74, 1988.

GOLD, J. R.; LI, Y. C.; SHIPLEY, N. S. e POWERS, P. K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **J. Fish Biol.** v. 37, p. 563-575, 1990.

GOMES, I. D.; ARAÚJO, F. G.; AZEVEDO, M. C. C. e PESSANHA, A. L. M. Biologia reprodutiva dos bagres marinhos *Genidens genidens* (Valenciennes) e *Cathorops spixii* (Agassiz) (Siluriformes, Ariidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Zool.** v. 16(2), p. 171-180, 1999.

_____ e ARAÚJO, F. G. Influences of the reproductive cycle on condition of marine catfishes (Siluriformes, Ariidae) in a coastal area at southeastern Brazil. **Environm. Biol. of Fish.** v. 71, p. 341-351, 2004.

GOMES, V.; PHAN, V. N. e PASSOS, M. J. A. C. R. The karyotype of a marine catfish, *Bagre bagre*, from Brazil. **Japan J. Ichthyol.** v. 37(3), p. 321-323, 1990.

_____; PHAN, V. N. e PASSOS, M. J. A. C. R. The karyotype of *Cathorops* sp, a marine catfish from Brazil. **Bol. Inst. Oceanogr.** v. 40(1/2), p. 87-91, 1992.

_____; PHAN, V. N. e PASSOS, M. J. A. C. R. Karyotypes of three species of marine catfishes from Brazil. **Bol. Inst. Oceanogr.** v. 42(1/2), p. 55-61, 1994.

GOODPASTURE C. e BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer in mammalian chromosomes using silver staining. **Chrom.** v. 53, p. 37-50, 1975.

HATANAKA, T e GALETTI Jr., P.M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz 1829 (Characiformes, Prochilodontidae), **Genet.** v. 122, p. 239-244, 2004.

HOWELL, W. M. e BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia.** v. 36, p. 1014-1015, 1980.

HSU, T. C.; SPIRITO, S. E. e PARDUE, M. L. Distribution of the 18 + 28 ribosomal genes in mammalian genomes. **Chrom.** v. 53, p. 25-36, 1975.

JACK, E. M.; HARRISON, C. J.; ALLEN, T. D. e HARRIS, R. The structural basis for C banding: a scanning electron microscope study. **Chrom.** v. 91, p. 363-368, 1985.

JESUS, C. M.; BERTOLLO, L. A. C e MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics in *Apareiodon affinis* (Pisces, Characiformes) and considerations regarding diversification of the group. **Genet.** v. 105, p. 63-67, 1999.

JIANXUN, C.; XIUHAI, R. e QIXING, Y. Nuclear DNA content variation in fishes. **Cytol.** v. 56, p. 425-429, 1991.

KANTEK, D. L. Z.; NOLETO, R. B.; FENOCCHIO, A. S. e CESTARI, M. M. Cytotaxonomy, Heterochromatic Polymorphism and Natural Triploidy of a Species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) Endemic to the Iguaçu River Basin. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 50, p. 67-74, 2007.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C. e MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity.** v. 94, p. 180-186, 2005.

KIRPICHNIKOV, V. S. **Genet. Bas. Fish Select.** New York: Springer-Verlag, 1981.

KLINKHARDT, M.; TESCHE, M. e GREVEN, H. **Datab. Fish Chrom.** Magdeburg, 237p., 1995.

_____. Some aspects of karyoevolution in fishes. **Anim. Resear. Devel.** v. 47, p. 7-36, 1998.

LEGRANDE, W. H. The chromosome complement of *Arius felis* (Siluriformes, Ariidae). **Jap. J. Ichthyol.** p. 82-84, 1980.

_____. Chromosomal Evolution in North American Catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with Particular Emphasis on the Madtoms, *Noturus*. **Copeia.** v. 1, p. 33-52, 1981.

LEVAN, A., FREDGA, K. e SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas.** v. 52, p. 201-220, 1964.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 2ª ed. Rio de Janeiro - RJ: José Olympio, 1981.

MAISTRO, E. L. **Caracterização morfológica estrutural de cromossomos supranumerários em peixes**. 152p. Tese (Doutorado. P. P. G. em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética) - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, 1996.

_____; OLIVEIRA, C. e FORESTI, F. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Rhamdia hilarii* (Teleostei, Pimelodidae): C-banding, silver nitrate and CMA₃ staining, and restriction endonuclease banding. **Cytol.** v. 67(1), p. 25-31, 2002.

MANDRIOLI, M. e MANICARDI, G. C. Cytogenetics and molecular analysis of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Osteichthyes). **Genet.** v. 111, p. 433-438, 2001.

_____; MANICARDI, G. C.; MACHELLA, N. e CAPUTO, V. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). **Genet.** v. 110, p. 73-78, 2001.

MARCENIUK, A. P. **Relações filogenéticas e revisão dos gêneros da família Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes)**. Tese (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

_____. Chave para identificação das espécies de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) da costa brasileira. **B. Inst. Pesca.** v. 31(2), p. 89-101, 2005.

_____ e MENEZES, N. A. Systematics of the family Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes), with a redefinition of the genera. **Zootaxa.** v. 1416, p. 1-126, 2007.

MARGALEF, R. **Ecologia**. Barcelona: Ed. Omega, 951p., 1977.

MARGARIDO, P. V. e GALETTI JR, P. M. Amplification of a GC-rich heterochromatin in the freshwater fish *Leporinus desmotes* (Characiformes, Anostomidae). **Genet. Mol. Biol.** v. 23(3), 2000.

MARTINEZ, J. L., MORÁN, P., GARCIA-VÁZQUEZ, E. e PENDÁS, A. M. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenet. Cell Genet.** v. 73, p. 149-152, 1996.

MARTINEZ, E. R. M.; OLIVEIRA, C. e FORESTI, F. Cytogenetic analyses of *Pseudopimelodus mangurus* (Teleostei, Siluriformes, Pseudopimelodidae). **Cytol.** v. 69(4), p. 419-424, 2004.

MARTINS, C. e GALETTI Jr., P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chrom. Research.** v. 7, p. 363-367, 1999.

_____ e GALETTI, P. M. Jr. . Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genet.** v. 111, p. 439–446, 2001.

MATHEY, R. **Les chromosomes des Vertébrés**. Lausanne: Rouge, 1949.

MAYR, B., KALAT, M. e RAB, P. Heterochromatins and band karyotypes in three species of salmonids. **Theor. Appl. Genet.** v. 76, p. 45-53, 1988.

MENEZES, N. A.; BUCKUP, P. A.; FIGUEIREDO, J. L. e MOURA, R. L. **Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil**. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 160p., 2003.

MEZZANOTTE, R.; BIANCHI, U.; VANNI, R. e FERRUCI, L. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 36, p. 562-566, 1983.

MISHIMA, M. e TANJI, S. Fatores ambientais relacionados à distribuição e abundância de bagres marinhos (OSTEICHTHYES, ARIIDAE) no complexo estuarino lagunar de Cananéia (25°S; 48°W). **Bol. Inst. Pesca.** v. 10, p. 17-27, 1983.

MOLINA, J.; MOLERO, T.; HERNÁNDEZ, L.; ACOSTA, D.; HERNÁNDEZ, J. e VILLAMEDIANA, P. Cariotipo del bagre guatero *Hexanematichthys herbergii* (Ariidae: Siluriformes) del estrecho del Lago de Maracaibo, Venezuela. **Bol. Centro Invest. Biol.** v. 38(3), 2004.

MOLINA, W. F. e GALETTI Jr., P.M. Karyotypic changes associated to the dispersive potential on Pomacentridae. **J. Exper. Mar. Biol. Ecol.** v. 309/1(109), p. 01-11, 2004.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C e GALETTI Jr., P. M. Structure and variability of nucleolar organizing regions in Paradontidae fish. **Canad. J. Genet. Cytol.** v. 26(5), p. 564-568, 1984.

_____; BERTOLLO, L.A.C e GALETTI Jr. Distribution of sex chromosome mechanism in neotropical fish and description of ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). **Caryol.** v. 46(3), p. 115-125, 1993.

MOY-THOMAS, J. A. e MILES, R. S. **Paleozoic fishes**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 259p., 1971.

NANDA, I., FEICHTINGER, W., SCHMID, M., SCHRÖDER, J. H., ZISCHLER, H. e EPPLEN, J. T. Simple repetitive sequences are associated with the differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. **J. Mol. Evol.** v. 30, p. 456-462, 1990.

_____; SCHARTL, M.; FEICHTINGER, W.; EPPLEN, J. T. e SCHMID, M. Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. **Chrom.** v. 101, p. 301-310, 1992.

NIRCHIO, M. e OLIVEIRA, C. **Citogenética de Peces**. 212p., 2006.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons Inc., 523p., 1994.

NOLETO, R. B.; VICARI, M. R.; CIPRIANO, R. R; ARTONI, R. F. e CESTARI, M. M. Physical mapping of 5S and 45S rDNA loci in pufferfishes (Tetraodontiformes). **Genet.** v. 130, p. 133-138, 2007.

OHNO, S. e ATKIN, N. B. Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. **Chrom.** v. 18, p. 455-466, 1966.

_____. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1967.

_____. **Evolution by gene duplication**. New York: Springer-Verlag, 160p., 1970.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A. e TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome Formulae of Neotropical Freshwater Fishes. **Brazil. J. Genet.** v. 11(3), p. 577-624 , 1988.

_____; ALMEIDA-TOLEDO, L. F., MORI, L. e TOLEDO-FILHO, S. A. Extensive chromosomal rearrangements and nucleolar DNA content changes in the evolution of the armoured catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **J. Fish Biol.** v. 40, p. 419-431, 1992.

_____; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. e FORESTI, F. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: VII SIMPÓSIO DE CITOGÊNETICA E GENÉTICA DE PEIXES, Manaus – AM. **Res...** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 119p., 2000.

OLIVEIRA, C. e GOSZTONYI, A.E. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in siluriformes. **Caryol.** v. 53(1), p. 31-37, 2000.

OZOUF-COSTAZ, C. e FORESTI, F. Fish cytogenetics research: advances, applications and perspectives. In: Proceedings of the 7th International Congress of Ichthyology. **Netherl. J. Zool.** v. 42(2-3), p. 277-290, 1992.

_____; PISANO, E.; THAERON, C. e HUREAU, J. C. Antarctic fish chromosome banding: significance for evolutionary studies. **Cybium.** v. 21(4), p. 399-409, 1997.

PARDUE, M. L. e HENNING, W. Heterochromatin: junk or collectors item? **Chrom. Focus.** v. 100, p. 3-7, 1990.

PATERSON, A. W. e WHITFIELD, A. K. Do SHALLOW- water habitats function as refugia for juvenile fishes? **Estuar. Coast. Shelf. Sci.** v. 51, p. 359-364, 2000.

PENDÁS, A. M., MÓRAN, P. e GARCÍA-VAZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in *Atlantic salmon*. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 63, p. 128-130, 1993.

_____; MÓRAN, P.; FREIJE, J. P. e GARCÍA-VAZQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 67, p. 31–36, 1994.

PINKEL, D., STRAUME, T. e GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceed. Nat. Acad. Scien.** v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PORTO, J. I. R. e FELDBERG, E. . Comparative cytogenetic study of the armored catfishes: genus *Hoplosternum* (Siluriformes, Callichthyidae). **Rev. Bras. Genét.** v. 15(2), p. 359-367, 1992.

QUEIROZ, G. M. N de, SPACH, H. L., MORELOS, M. S., SANTOS, L. O. e JUNIOR, R. S. Caracterização da ictiofauna demersal de duas áreas do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Biocências.** v. 14(2), p. 112-124, 2006.

RAMÍREZ, A. E. **Estudios citogenéticos en el Bagre marino *Arius melanopus***. 48p. Tesis Profesional - Facultad de Ciencias, U.N.A.M., 1985.

RAB, P. K. M., REED, F. A., PONCE, L. e PHILLIPS, R. B. A new method for detection of nucleolus organizer regions in fish chromosomes using denaturation and propidium iodide staining. **Biotech. Histochem.** v. 71, p. 157–162, 1996.

RAVEDUTTI, C. G. e JÚLIO Jr., H. F. Cytogenetic Analysis of three species of the Neotropical Family Auchenipteridae (Pisces, Siluriformes) from the Paraná River Basin, Brazil. **Cytol.** v. 66, p. 65-70, 2001.

RISHI, K. K.; SINGH, J. e HAOBAM, M.S. Karyological study on a marine catfish, *Arius dussumieri* (Val.) (Ariidae: Siluriformes) **Chrom. Inf. Serv.** v. 34, p. 7-9, 1983.

SAITOH, K.; MIYA, M.; INOUE, J.G.; ISHIGURO, N.B. e NISHIDA, M. Mitochondrial Genomics of Ostariophysan Fishes: Perspectives on Phylogeny and Biogeography. **J. Molec. Evol.** v. 56(4), p. 464-472, 2003.

SANTO, R. V. do E. e ISAAC, V. J.. Alimentação e Aspectos da Reprodução da *Uricica Cathorops spixii* (AGASSIZ, 1829) (OSTEYCHTHYES, SILURIFORMES ARIIDAE), no Estuário do Rio Caeté (Município de Bragança - PA). **Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi.** ser. Zool. v. 15(1), p. 95-111, 1999.

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluriformes: Loricariidae). *In*: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S. e LUCENA, C. A. S. (Eds.). **Phylog. Classific. Neotrop. Fishes**, EDIPUCRS. p.375-400, 1998.

SCHWEIZER D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chrom.** v. 58, p. 307-324, 1976.

SCHMID, M. e GUTTENBACH, M. Evolutionary diversity of reverse fluorescence chromosome bands in vertebrates. **Chrom.** v. 97, p. 101-114, 1988.

SCHWEIZER, D. e LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. **Chrom. Today.** v. 9, p. 61–74, 1987.

SCZEPANSKI, T. S.; NOLETO, R. B.; KANTEK, D. L. Z.; CORTINHAS, M. C. S e CESTARI, M. M. Classical and molecular cytogenetics of *Atherinella brasiliensis*

(Teleostei, Atheriniformes) from South coast of Brazil. **J. Fish Biol.** v. 71 (Supplement C), p. 453–460, 2007.

SINGH, L.; PURDOM, I. F. e JONES, K. W. Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. **Chrom.** v. 79, p. 137-157, 1980.

SOLA, L.; ROSSI, A. R.; IASELLI, V.; RASCH, E. M. e MONACO, P. J. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3, and silver staining. **Cytogenet. Cell Genetic.** v. 60, p. 229-235, 1992.

_____; BRESSANELLO, S.; ROSSI, A. R.; IASELLI, V.; CROSSETTI, D. e CATAUDELLA, S. A karyotype analysis of the genus *Dicentrarchus* by different staining techniques. **J. Fish Biol.** v. 43, p. 329-337, 1993.

SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O. e GALETTI Jr., P. M. Heterochromatin differentiation in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. **Brazil. J. Genet.** v. 19(3), p. 405-410, 1996.

SOUZA, L.; GIULIANO-CAETANO, L. e DIAS, A. L. Karyotypic study of three species of *Pimelodus* (Pisces, Pimelodidae) from the Paraguay river basin. **Cytol.** v. 68(4), p. 345-350, 2003.

_____; CAETANO, L. G. e DIAS, A.L. (a). Karyotype and heterochromatin characterization of two species of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Parana River basin of Brazil. **Folia Biol.** v. 52, p. 165-169, 2004.

_____; SWARÇA, A. C. e DIAS, A. L.(b) Analysis of the nucleolus organizer regions in 5 species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae), using AgNO₃, CMA₃ and FISH with the 18S rDNA probe. **Caryol.** v. 57(2), p. 144-150, 2004.

STERBA, G. **Freshwater fishes of the world**. 2 ed. USA: Tropical Fish Hobbyist Publications, 887p, 1973.

STOLF, R. ; SWARÇA, A. C. ; GIULIANO-CAETANO, L. e DIAS, A. L. Analyses of karyotype and nucleolus organizer regions of *Imparfinis* aff. *schubarti* (Siluriformes, Pimelodidae) of the basin of the Tibagi river, Paraná, Brazil. **Caryol.** v. 57(4), p. 348-352, 2004.

SULLIVAN, J. P.; LUNDBERG, J. G. e HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. **Molec. Phylog. Evolut.** In press, 2006.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell Res.** v. 75, p. 304-306, 1972.

SUZUKI, H., SAKURAI, S. e MATSUDA, Y. Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet. Cell Genet.** v. 72, p.1-4, 1996.

SWARÇA, A. C. ; CAETANO, L. G. e DIAS, A. L. Cytogenetic Characterization through Chromosomic Banding of *Pinirampus pirinampu* from the Tibagi River Basin, PR/Brazil. **Caryol.** v. 52(1/2), p. 31-35, 1999.

_____; GIULIANO-CAETANO, L. e DIAS, A.L. Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Genet.** v. 110, p. 97-100, 2000.

_____; CAETANO, L. G. e DIAS, A. L. (a). Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus*. **Genet.** v. 1(110), p. 97-100, 2001.

_____; FENOCCHIO, A. S. ; DIAS, A. L. e CESTARI, M. M. (b). Heteromorfismo de regiones organizadoras nucleolares en *Steindachneridion* sp. (Pisces, Pimelodidae, Siluriformes): su determinación mediante impregnación argéntica, CMA₃, y FISH con sondas de DNAr. In: XXX CONGRESO ARGENTINO DE GENETICA, 2001. **Res...** Mar del Plata. Journal of Basic & Applied Genetics, v. 14, p. 88, 2001.

SWARÇA, A. C. ; CESTARI, M. M. ; CAETANO, L. G. e DIAS, A. L. (c). Cytogenetic Characterization of the Large South American Siluriform Fish Species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). **Chrom. Science.** v. 5, p. 51-55, 2001.

_____; VIDOTTO, A. P. e DIAS, A. L. Cytogenetic characterization in *Pimelodella* aff. *avanhandavae* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Tibagi River (Paraná State, Brazil). **Caryol.** v. 56(4), p. 421-425, 2003.

TEUGELS, G. G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. **Aquat. Living Resour.** v. 9, p. 9-34, 1996.

VENERE, P.C. e GALETTI Jr., P.M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. **Braz. J. Genet.** v. 12(1), p. 17-25, 1989.

VICENTE, V. E. **Estudos cromossômicos em três populações de *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae)**. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 1994.

WASKO, A. P. e GALETTI Jr., P. M. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genet. Mol. Biol.** v. 23(1), p. 135-138, 2000.

WICHMAN, H. A.; PAYNE, C. T.; RYDER, O. A. HAMILTON, M. J.; MALTBIÉ, M. e BAKER, R. J. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **J. Hered.** v. 2(5), p. 367-377, 1991.

Sites Consultados:

LISTA DE PEIXES NEOTROPICAIS DE ÁGUA DOCE. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2007. Disponível em: <<http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Freshwater%20Neotropical%20fishes.pdf>> Acesso em 20/08/2007.

LISTA DE PEIXES NEOTROPICAIS MARINHOS. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2007. Disponível em: <<http://www.ibb.unesp.br/laboratorios/Marine%20Neotropical%20fishes.pdf>> Acesso em 20/08/2007

LUNDBERG, J. G. e FRIEL, J. P. SILURIFORMES, CATFISHES. Version 20, jan 2003 (under construction). Disponível em: <<http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20>> In: The Tree of Life Web Project <<http://tolweb.org/>> Acesso: 14/07/2007